

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**COMPORTEMENT DES PREMIERS MAILLONS DU RÉSEAU TROPHIQUE
MARIN EXPOSÉS AU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET-B ET AUX
CONTAMINANTS DISSOUS**

THÈSE

**PRÉSENTÉE A
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU PROGRAMME DE DOCTORAT CONJOINT EN OCÉANOGRAPHIE**

PHILOSOPHIAE DOCTOR (OCÉANOGRAPHIE)

**PAR
PEGGY SARGIAN**

Soutenue le 11 mars 2005 devant le jury composé de :

Dr. Christian Nozais

Dr. Émilien Pelletier

Dr. Serge Demers

Dr. Walter P. Mac Cormack

Président

Directeur de thèse

Codirecteur de thèse

Membre externe

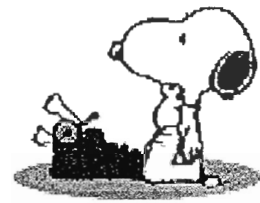
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

À mes parents,

*avec toute ma
reconnaissance et tout mon
amour.*



Peg

RÉSUMÉ

La déplétion de la couche d'ozone dans la stratosphère influence de manière significative les effets du rayonnement ultraviolet-B (RUV-B) atteignant la surface de la terre. C'est pourquoi, un intérêt scientifique croissant a émergé au cours des deux dernières décennies et démontre les effets délétères du RUV-B sur les écosystèmes aquatiques. Cependant, les activités anthropiques impliquent également la libération directe de contaminants dans l'environnement, tels que les hydrocarbures pétroliers et le tributyltin (TBT), considérés comme d'importance environnementale majeure, et exposant les organismes aquatiques à des stress multiples. À ce jour, très peu d'études ont considéré l'influence d'une co-exposition du RUV-B et des contaminants sur le réseau trophique marin.

L'objectif de ce travail a donc été de développer le concept de stress multiples et de considérer les effets combinés du RUV-B et des hydrocarbures dissous d'une part et du RUV-B et du TBT d'autre part, à l'aide d'une approche en microcosme, et cela sur les premiers maillons du réseau trophique marin. Ainsi, une portion de l'écosystème (i.e. phyto- et bactérioplancton) a été isolée de son environnement et soumise à différentes conditions expérimentales sur une période de 5 jours. Deux traitements de lumière ont été considérés : RUV-B naturel et RUV-B accru. De même, deux traitements avec contaminants ont été pris en compte, et cela sous les deux traitements de lumière précédents, donnant lieu ainsi aux quatre traitements suivants, chacun en triplicata :

- ✓ RUV-B naturel (NUVBR)

- ✓ Contamination sous RUV-B naturel (NUVBR+Contaminant)
- ✓ RUV-B accru (HUVBR)
- ✓ Contamination sous RUV-B accru (HUVBR+Contaminant)

Une première expérience fut réalisée à Rimouski (Canada, 48,6°N, 68,2°W) dans laquelle aussi bien les hydrocarbures dissous (fraction soluble d'un pétrole brut : WSF) que le tributylétain représentaient la source de contamination sous RUV-B naturel et accru. Par la suite, une deuxième expérience a été mise en place à Ushuaia (Argentina, 54,8°S, 68,2°W) selon le même protocole, mais dans laquelle seule l'addition de la WSF fut considérée et ce afin d'identifier l'importance d'une exposition périodique au RUV-B en comparant deux latitudes.

Aux deux sites, les résultats démontraient l'impact à court-terme du RUV-B d'une part, et de la WSF, d'autre part sur les premiers maillons du réseau trophique. Cependant, l'importance des effets du RUV-B a été différente selon l'environnement considéré, tout comme l'impact de la contamination par les hydrocarbures, d'où une différence de réaction du système face au double stress RUV-B et WSF. Ainsi, à Rimouski, la WSF a engendré des effets beaucoup plus marqués que ceux induits par l'augmentation du RUV-B, masquant alors les effets délétères du stress lumineux et donc toute identification possible d'une quelconque interaction entre les deux stress. En effet, le RUV-B et la WSF présentent des mécanismes de phytotoxicité semblables, affectant l'appareil photosynthétique, endommageant l'ADN et conduisant à la formation d'espèces réactives

d'oxygène. À l'inverse, l'effet plus modéré de la WSF à Ushuaia et l'influence plus importante du RUV-B sur les premiers maillons du réseau trophique marin ont permis d'identifier clairement une interaction synergique entre les deux stress, avec pour résultante un changement dans la composition spécifique aussi bien phytoplanctonique que bactérienne.

Si l'on considère maintenant l'influence de l'autre contaminant de cette étude, le TBT, avec une co-exposition au RUV-B accru, sur les composantes phytoplanctonique et bactérienne, une interaction synergique fut identifiée sans ambiguïté conduisant à un catabolisme cellulaire important, impliquant aussi bien une perturbation du cycle cellulaire qu'une inhibition de la photosynthèse. En effet, contrairement à la WSF, le TBT présente des mécanismes de phytotoxicité différents de ceux du RUV-B d'où une distinction nette entre les effets du RUV-B d'une part, les effets du TBT d'autre part, et une exacerbation de ces effets individuels lorsque considérés conjointement.

L'ensemble de ces résultats confirme ainsi l'importance de l'évaluation des stress multiples sur les écosystèmes aquatiques dans la conjoncture actuelle des changements climatiques déjà perceptibles .

ABSTRACT

Decreasing concentrations of ozone in the stratosphere radically influence the effects of ultraviolet-B radiation (UVBR) reaching the earth's surface. Therefore, an increasing scientific concern has emerged during the last two decades and demonstrated the deleterious effects of UVBR on aquatic ecosystems. However, anthropogenic impact imply also the direct release of contaminants in the environment, such as petroleum hydrocarbons and tributyltin (TBT), known to be of environmental concern, and exposing aquatic organisms to multiples stressors. To date, very few studies have considered the influence of a co-exposure of UVBR and contaminants on marine food webs.

The aim of the present study is therefore to assess the multiple stresses concept and to consider combined effects of UVBR and petroleum hydrocarbons (i.e. water soluble fraction of crude oil: WSF) on one hand, and UVBR and TBT on the other hand. In this way, a microcosm approach is apply in which a part of the whole-ecosystem (i.e. phyto- and bacterioplankton) is isolated from its natural environment, an exposed to different light conditions over a 5-day experiment. Two UVBR treatments are considered: natural and increased UVBR, with or without contaminants. Microcosms (in triplicate) were identified owing to their light condition and contamination as follow:

- ✓ NUVBR : natural UVBR
- ✓ NUVBR+Contaminant : contamination under NUVBR
- ✓ HUVBR : increased UVBR
- ✓ HUVBR+Contaminant : contamination under increased UVBR

A first experiment is carried out in Rimouski (Canada, 48.6°N, 68.2°W) for which both hydrocarbons and TBT are added under NUVBR and HUVBR treatments. A second experiment take place in Ushuaia (Argentina, 54.8°S, 68.2°W) with the same experimental design, but only with consideration for hydrocarbon contamination in order to assess the importance of the UVBR sensitivity due to the historic light environment on the biological responses to dual stress.

From the two different sites considered, results demonstrate the separately impact of both UVBR and WSF. However, the importance of these individual effects is somewhat different according to the latitude, resulting therefore in a different reaction of the system to the dual stress RUV-B × WSF. For Rimouski experiment, WSF addition generate stronger deleterious effects than those induce by enhanced UVBR, suggesting that UVBR-induced effects can be completely masked. Any possible interaction between UVBR and WSF cannot be identified. Indeed, both stresses present similar phytotoxicity mechanisms, affecting photosynthetic apparatus, inducing DNA damages and resulting in the formation of reactive oxygen species. Conversely, for Ushuaia experiment, WSF addition result in more moderate effects allowing the assessment of synergistic effects between UVBR and WSF on the first level of the marine food web, with a shift in species composition for both phytoplankton and bacterioplankton.

When considering the co-occurrence of TBT and UVBR, a synergistic interaction is clearly identified. Indeed, and contrary to the WSF, TBT is compound presenting different

phytotoxicity mechanisms than those observed for UVBR, allowing the distinction between UVBR effects on one hand, TBT effects on the other hand, and an exacerbation of these individual effects when jointly considered.

All of these results confirm the importance of the assessment of multiple stressors on aquatic ecosystems with the already perceptible climatic changes.

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'un programme de recherche international mis en place par l'"Inter American Institut for global change" (IAI) et financé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), ayant pour objectif principal l'étude des effets d'une augmentation du RUV-B sur les écosystèmes marins en tant que perturbation additionnelle résultant de la diminution de la couche d'ozone. Les travaux de cette thèse ont porté plus particulièrement sur les effets combinés du RUV-B et de certains contaminants sur les premiers maillons du réseau trophique marin.

Cette thèse comprend en premier lieu une introduction générale exposant les connaissances actuelles des effets non seulement de l'augmentation du RUV-B, mais également des deux contaminants (i.e. hydrocarbures pétroliers et tributylétain) sur les écosystèmes aquatiques, de même que l'importance du RUV-B sur la photochimie de ces écosystèmes et son rôle dans les processus de dégradation des contaminants. Cette introduction développe également l'intérêt d'une approche en microcosme pour aborder une telle problématique. En second lieu, trois chapitres détaillant les résultats obtenus au cours de ce travail sont présentés sous forme d'articles scientifiques, rédigés en langue anglaise. Enfin, une discussion générale et une conclusion sur la portée de ce travail parachève ce document.

Le premier chapitre est actuellement sous presse dans la revue internationale *Marine Ecology Progress Series* : Sargian P, Mostajir B, Chatila K, Ferreyra GA, Pelletier É,

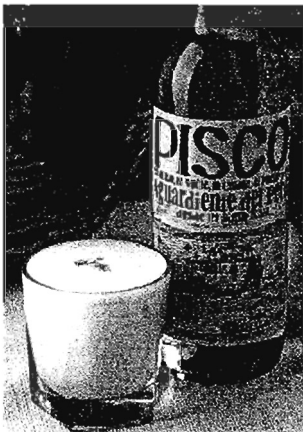
Demers S. Non-synergistic effects of water soluble crude oil and enhanced ultraviolet-B radiation on a natural planktonic assemblage.

Le troisième chapitre est actuellement sous presse dans la revue internationale *Aquatic Toxicology* : Sargian P, Pelletier É, Mostajir B, Ferreyra GA, Demers S. TBT toxicity on a natural planktonic assemblage exposed to enhanced ultraviolet-B radiation.

REMERCIEMENTS

ÉVOLUER, APPRENDRE DE CHACUN ET EN RESSORTIR PLUS FORT, ces quelques mots pour définir ces dernières années passées au sein d'une équipe multidisciplinaire et internationale. Car avouons le, un tel projet n'aurait pu se faire sans l'aide de nombreuses personnes, et en tout premier lieu, et plus particulièrement, le Dr. Émilien Pelletier. Tout d'abord toute ma reconnaissance pour avoir accepté de diriger ce travail dans un domaine très éloigné (les UV !) de ses axes de recherche. De plus, je ne saurais citer Émilien sans parler de sa qualité exceptionnelle d'encadrement, de sa confiance, de la liberté d'action qu'il m'a accordée pour mener à bien mes différentes expériences et de son implication personnelle. Merci pour tout cela, et plus encore.

Pour toi Émilien, ces quelques lignes :



Dans un shaker : mélanger 3 mesures de Pisco
 1 ½ mesure de citron vert
 1-2 c. à soupe de sirop de canne
 1 blanc d'œuf
 de la glace

Agiter pour refroidir jusqu'à l'obtention d'une mousse
 Déguster ...

Associé à Émilien, je remercie le Dr. Serge Demers. "Papa Serge" qui, malgré toutes les responsabilités qu'incombe la direction d'un institut comme l'ISMER, tu as su remplir comme il se doit ta fonction de co-directeur. Merci pour m'avoir accordé quelques heures par-ci, par-là, mais Ô combien précieuses, dans ton emploi du temps Ô combien chargé !

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans la formation de mon jury de thèse. Je tiens pour cela à remercier le Dr. Christian Nozais d'avoir accepté de présider ce jury. J'adresse également mes remerciements au Dr. Walter P. Mac Cormack d'avoir bien voulu accepter la fonction d'examineur externe sur mon jury de thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance au Dr. Behzad Mostajir, non seulement pour son expertise scientifique, ses précieux conseils, son écoute et sa disponibilité qui m'ont été d'une aide inestimable, mais également pour son amitié. Et je n'oublierai pas "*Des années de lumière de 50 ans d'expérience*".

Merci au Dr. Gustavo A. Ferreyra, pour son appui constant et ses excellentes critiques durant la rédaction de ce travail, de même que pour son implication dans le bon déroulement de l'expérience d'Ushuaia. Gustavo, "*Trabajar contigo fue un verdadero placer*".

Je tiens également à remercier les autres membres de l'équipe UV, impliqués de près ou de loin dans ce projet : le Dr. Khaled Chatila (Égypte), les Drs S. Roy et M. Gosselin (Canada), le Dr. Sonia M. F. Ganesella (Brésil), les Dr. Irene Schloss et Suzana Diaz (Argentine), ainsi que leurs équipes respectives dont je ne pourrai citer ici tous les noms. Un gros merci à tous pour avoir su créer une formidable ambiance de travail sous toutes les latitudes. J'en profite pour remercier l'"Instituto Oceanográfico" (Universidade de São Paulo universidade), "El Centro Austral de Investigaciones Científicas" (CADIC) et

l'"Instituto Antartico Argentino" (IAA). Je désire également remercier le Conseil de Recherche en Science et en Génie du Canada (CRSNG) pour le financement de ce projet de recherche.

Pour reprendre mes premiers mots "*Évoluer, apprendre de chacun et en ressortir plus fort*", ces mots je les dédie également aux amitiés qui ont vu le jour de ce côté ci de l'océan. À ceux encore présents, ceux qui sont partis, et ceux qui sont revenus ... *MERCI* ! Parce que une vie professionnelle ne saurait être un tout, je vous remercie d'avoir été là, pour partager de bons moments et m'avoir transmis un peu de votre philosophie de la vie. Une liste exhaustive me prendrait encore plusieurs pages, alors sans citer de nom, à toutes et à tous merci d'avoir été là et d'avoir créé ce cercle "*Familial*" indispensable à tout équilibre... .

Je ne saurais terminer ces remerciements sans m'adresser à ce que j'ai de plus précieux, à savoir dans mon cœur, ma famille. Pour toute leur patience, leur générosité, leur sacrifice, leur soutien inconditionnel dans tout ce que j'ai entrepris, leurs encouragements, leur présence à mes côtés où que ce soit... *Maman, Papa*, je ne saurais vous exprimer toute ma reconnaissance ... *ALORS TOUT SIMPLEMENT MERCI*... . Et puis il y a ma *K-Ro*...je ne t'oublie pas...

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iv
ABSTRACT	viii
AVANT-PROPOS	xii
REMERCIEMENTS	xv
TABLE DES MATIÈRES	xix
LISTE DES FIGURES	xxiii
LISTE DES TABLEAUX	xxviii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xxx
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CONCEPT D'INTERACTIONS ET DE STRESS MULTIPLES	2
COUCHE D'OZONE ET RAYONNEMENT ULTRAVIOLET-B.....	4
RÉACTIONS PHOTOCHEMIQUES ET RAYONNEMENT ULTRAVIOLET-B	9
COMMUNAUTÉS PLANCTONIQUES ET RAYONNEMENT ULTRAVIOLET-B	16
Phytoplancton et rayonnement ultraviolet-B	16
Bactérioplancton, réseaux trophiques et rayonnement ultraviolet-B	24
CONTAMINANTS, COMMUNAUTÉS PLANCTONIQUES ET RAYONNEMENT ULTRAVIOLET-B	28
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	29
Biodégradation et toxicité	32
Photodégradation et phototoxicité	36
Tributylétain	41
Biodégradation et toxicité	44
Photodégradation	48
APPROCHE EN MÉSOCOSMES	50
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	54

CHAPITRE 1: NON-SYNERGISTIC EFFECTS OF WATER SOLUBLE CRUDE OIL AND ENHANCED ULTRAVIOLET-B RADIATION ON A NATURAL PLANKTONIC ASSEMBLAGE 61

RÉSUMÉ.....	62
ABSTRACT.....	64
INTRODUCTION.....	66
MATERIALS AND METHODS.....	69
Experimental set-up.....	69
Physical measurements in the mesocosms.....	71
Chemical measurements in the microcosms.....	73
Biological measurements in the microcosms and calculations.....	75
Statistical analyses.....	77
RESULTS.....	79
Light and UVBR irradiances.....	79
Chemical parameters.....	81
Biological parameters.....	90
DISCUSSION.....	102
Relevance of UVBR exposure levels.....	103
Relevance of WSF toxicity.....	104
Mechanisms and relevance of WSF addition upon the planktonic assemblage.....	106
Mechanisms and relevance of enhanced UVBR upon the planktonic assemblage...	108
Relevance of combined effects of WSF and enhanced UVBR.....	110
REFERENCES.....	113

CHAPITRE 2: CASE STUDY OF MULTIPLES STRESSORS ON A NATURAL PLANKTONIC ASSEMBLAGE: WATER SOLUBLE CRUDE OIL AND ENHANCED UVBR LEVEL AT USHUAIA..... 122

RÉSUMÉ.....	123
ABSTRACT.....	125
INTRODUCTION.....	127

MATERIALS AND METHODS.....	131
Experimental set-up.....	131
Incident solar radiation & UV profiles.....	132
WSF preparation, addition and chemical analysis.....	133
Fluorescence induction analysis.....	134
Pigment analysis.....	135
Flow cytometry analysis.....	136
Heterotrophic bacterial counts.....	138
Statistical analysis.....	138
RESULTS.....	139
Light environment conditions and UVBR levels.....	139
Chemical analysis.....	139
Fluorescence induction.....	144
Pigment analysis.....	145
Flow cytometry results: abundance and physiology of cells.....	151
Heterotrophic bacterial counts.....	159
DISCUSSION.....	164
UVBR effects on the natural planktonic assemblage.....	165
WSF effects on the natural planktonic assemblage.....	168
Relevance of the UVBR and WSF co-exposure.....	170
CONCLUSIONS.....	172
REFERENCES.....	173

**CHAPITRE 3: TBT TOXICITY ON A NATURAL PLANKTONIC ASSEMBLAGE
EXPOSED TO ENHANCED ULTRAVIOLET-B RADIATION..... 182**

RÉSUMÉ.....	183
ABSTRACT.....	185
INTRODUCTION.....	187
MATERIALS AND METHODS.....	190

Experimental set-up	190
Tributyltin addition and chemical analyses	196
Biological analyses	197
Statistical analyses	201
RESULTS	202
Biochemical parameters	202
Chl <i>a</i> concentrations and in vivo fluorescence	204
Phytoplankton abundances, cellular characteristics and growth rates	207
Bacterial abundance and productivity	212
DISCUSSION	215
Magnification of TBT phytotoxicity under UVBR exposure	216
Direct and indirect feedbacks on bacterioplankton	221
CONCLUSIONS	222
REFERENCES	224
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	233
ANNEXE	249
BIBLIOGRAPHIE	251

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

- FIGURE 1. PRÉSENTATION DES TROIS CLASSES D'INTERACTION POSSIBLES ENTRE DEUX AGENTS (CHIMIQUES ET/OU NATURELS), SELON CALABRESE (1991)..... 3
- FIGURE 2. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE (A) LA FORMATION PHOTOCHIMIQUE DES MOLÉCULES D'OZONE (O_3), (B) DE L'INFLUENCE DES CHLOROFLUOROCARBONES (CFCs) DANS LA PRODUCTION D'ATOMES DE CHLORE RÉACTIFS ($Cl\cdot$) APRÈS PHOTODISSOCIATION PAR LE RAYONNEMENT SOLAIRE ULTRAVIOLET, ET (C) DESTRUCTION DES MOLÉCULES D'OZONE PAR LES ATOMES DE CHLORE ($Cl\cdot + O_3 \rightarrow ClO\cdot + O_2$) ET REMISE EN CIRCULATION D'ATOMES DE CHLORE RÉACTIFS DANS LE PROCESSUS DE DESTRUCTION DE LA COUCHE D'OZONE ($ClO\cdot + O\cdot \rightarrow O_2 + Cl\cdot \cup Cl\cdot + O_3 \rightarrow ClO\cdot + O_2 \cup$ ETC.)..... 6
- FIGURE 3. DIAGRAMME SCHÉMATIQUE (A) DE L'EXCITATION D'UNE MOLÉCULE DUE À L'ABSORPTION D'UN PHOTON ET LES DIFFÉRENTES VOIES DE RETOUR À L'ÉTAT FONDAMENTAL, ET (B) DU CONCEPT D'HOMO-LUMO 12
- FIGURE 4. DIAGRAMME SCHÉMATIQUE DES MÉCANISMES DE TYPE-I ET DE TYPE-II IMPLIQUÉS DANS LE PROCESSUS DE PHOTOSENSIBILISATION : INTERACTIONS DU PHOTOSENSIBILISATEUR AVEC L'OXYGÈNE ET/OU DES BIOMACROMOLÉCULES ET DOMMAGES CONSÉQUENTS 15
- FIGURE 5. INFLUENCES DU RUV-B, DU NIVEAU MOLÉCULAIRE AU NIVEAU DES COMMUNAUTÉS, SUR LES ORGANISMES PHOTOSYNTHÉTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE. (ADAPTE DE VINCENT & ROY 1993)..... 19
- FIGURE 6. PROCESSUS IMPLIQUÉS DANS LE DEVENIR (A) DES HYDROCARBURES, ET (B) DU TRIBUTYLÉTAIN (TBT) DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE..... 33

CHAPITRE 1

- FIGURE 1. SCHEMATIC VIEW OF THE EXPERIMENTAL SET-UP. TOP VIEW SHOWING THE POSITION OF MICROCOSMS INSIDE THE MESOCOSMS IN (A) HUVBR AND (B)

NUVBR TREATMENTS. (C) VERTICAL VIEW DEMONSTRATING THE POSITION OF MICROCOSMS IN THE WATER COLUMN OF THE MESOCOSMS.


(): INTAKE AND OUTFLOW OF THE WATER CIRCULATION PUMP; C: MICROCOSMS WITHOUT HYDROCARBONS; H: MICROCOSMS WITH HYDROCARBONS..... 72

FIGURE 2. (A) DAILY INTEGRATED INCIDENT IRRADIANCE AT 313 NM AND 380 NM, AND PAR MEASURED OVER THE 7-D PERIOD OF THE EXPERIMENT SHOWN TO ILLUSTRATE THE GENERAL METEOROLOGICAL CONDITIONS. (B) APPARENT ATTENUATION COEFFICIENTS (K_d , M^{-1}) FOR 313, 320, 340 AND 380 NM AND PAR AS DERIVED FROM IRRADIANCE DEPTH PROFILES IN THE MESOCOSMS. THE CORRESPONDING DEPTH (M, \pm SD) OF 1% NEAR SURFACE IRRADIANCE (0 M) AT EACH WAVELENGTH IS INDICATED BY THE BARS 80




Figure 3. SYNCHRONOUS FLUORESCENCE SPECTRA OF THE FORTIES CRUDE OIL () , INITIAL WSF () , AND INITIAL SAMPLING WATER (). ASSIGNMENT OF MAJOR PEAKS FROM WAKEHAM'S DATA (1977). SCAN EXCITATION-EMISSION WAVELENGTHS: 250-500 NM 85

FIGURE 4. SYNCHRONOUS FLUORESCENCE SPECTRA OF TOTAL DISSOLVED HYDROCARBONS IN (A) NUVBR+WSF, AND (B) HUVBR+WSF TREATMENTS, AND PARTICULATE HYDROCARBONS IN (C) NUVBR+WSF, AND (D) HUVBR+WSF TREATMENTS. A: INITIAL WSF, B: DAY 3, C: DAY 5, AND D: DAY 7 OF THE EXPERIMENT 86


FIGURE 5. TEMPORAL CHANGES OF (A) NITRITE + NITRATE, (B) PHOSPHATE, AND (C) SILICATE CONCENTRATIONS. (MEANS \pm SD). WATER TRANSFER FROM MESOCOSMS TO MICROCOSMS AND WSF ADDITION ON DAY 3 () 89


FIGURE 6. TEMPORAL CHANGES OF TOTAL CHLOROPHYLL *a* CONCENTRATIONS. (MEANS \pm SD). WATER TRANSFER FROM MESOCOSMS TO MICROCOSMS AND WSF ADDITION ON DAY 3 () 92


FIGURE 7. TEMPORAL CHANGES IN TOTAL ABUNDANCE OF PHYTOPLANKTON CELLS $< 20 \mu\text{M}$, AS DETERMINED BY FLOW CYTOMETRY. (MEANS \pm SD). *SIGNIFICANT DIFFERENCES ($P < 0.05$) BETWEEN TREATMENTS AND RELATIVE TO NUVBR. WATER TRANSFER FROM MESOCOSMS TO MICROCOSMS AND WSF ADDITION ON DAY 3 () 94


FIGURE 8. TEMPORAL CHANGES OF FORWARD SCATTER (FSC, CELL SIZE) FOR (A) 1-3 μM , AND (B) 3-10 μM FRACTIONS. (MEANS \pm SD). *SIGNIFICANT DIFFERENCES ($P < 0.05$) BETWEEN HUVBR+WSF AND ALL OTHER TREATMENTS. WATER TRANSFER FROM MESOCOSMS TO MICROCOSMS AND WSF ADDITION ON DAY 3 () 96

FIGURE 9. TEMPORAL CHANGES IN (A) BACTERIAL ABUNDANCE AS DETERMINED BY DAPI-FLUORESCENCE COUNTS, (B) TOTAL BACTERIAL ACTIVITY (TA), AND (C) SPECIFIC BACTERIAL ACTIVITY (SA), AS DETERMINED BY THYMIDINE INCORPORATION. (MEANS \pm SD). *SIGNIFICANT DIFFERENCES ($P < 0.05$) BETWEEN

TREATMENTS AND RELATIVE TO NUVBR. WATER TRANSFER FROM MESOCOSMS TO MICROCOSMS AND WSF ADDITION ON DAY 3 (\longrightarrow)	99
---	----

CHAPITRE 2

FIGURE 1. SCHEMATIC VIEW OF (A) THE LOCALIZATION OF THE AREA UNDER THE ANTARCTIC OZONE HOLE ON OCT. 15, 2001 (FROM NASA TOTAL OZONE MAPPING SPECTROMETER (TOMS) WEB SITE: HTTP://JWOCKY.GSFC.NASA.GOV/), (B) THE LOCALIZATION OF THE EXPERIMENTAL SITE ON THE SOUTHERN TIP OF SOUTH AMERICA, (C) THE RANDOM POSITION OF THE MESOCOSMS AT THE WHARF STRUCTURE, AND (D) THE EXPERIMENTAL DESIGN OF THE MICROCOSMS. C: MICROCOSMS WITHOUT HYDROCARBONS; H: MICROCOSMS WITH HYDROCARBONS.....	130
FIGURE 2. SYNCHRONOUS FLUORESCENCE SPECTRA OF PATAGONIAN CRUDE OIL AS WELL AS SPECTRA OF DISSOLVED AND PARTICULATE PHASES OF THE INITIAL WSF CRUDE OIL. ASSIGNMENT OF MAJOR PEAKS FROM WAKEHAM'S DATA (1977). SCANS EXCITATION-EMISSION WAVELENGTHS: 250-500 NM.....	142
FIGURE 3. SYNCHRONOUS FLUORESCENCE SPECTRA OF DISSOLVED (A) AND PARTICULATE (B) HYDROCARBONS IN NUVBR+WSF, AND SYNCHRONOUS FLUORESCENCE SPECTRA OF DISSOLVED (C) AND PARTICULATE (D) HYDROCARBONS IN HUVBR+WSF. A: INITIAL WSF, B: DAY 1, C: DAY 3, AND D: DAY 5. SCANS EXCITATION-EMISSION WAVELENGTHS: 250-500 NM.....	143
FIGURE 4. TEMPORAL CHANGES IN PHOTOCHEMICAL YIELD ($F_v/F_M = (F_M - F_0)/F_M$) AS MEASURED BY PAM FLUOROMETER DURING THE EXPERIMENT. ^SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR, ^B SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR+WSF, AND + SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO HUVBR. (MEANS + SD).....	146
FIGURE 5. TEMPORAL CHANGES IN TOTAL CHL A CONCENTRATIONS. ^SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR, ^B SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR+WSF, AND + SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO HUVBR. (MEANS + SD).....	148
FIGURE 6. GROWTH RATES ($K_{PIGMENT}$; D^{-1}) CALCULATED FOR THE MARKER PIGMENTS: FUcoxANTHIN, CHLOROPHYLL B, AND ALLOxANTHIN. (MEANS + SD).....	150
FIGURE 7. TEMPORAL CHANGES OF TOTAL ABUNDANCE OF PHYTOPLANKTON <20 μ M. ^SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR, ^B SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR+WSF, AND + SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO HUVBR. (MEANS + SD).....	155

FIGURE 8. TEMPORAL CHANGES IN FSC FOR (A) NANOPHYTOPLANKTONIC FRACTION AND (B) PICOPHYTOPLANKTONIC FRACTIONS, AND TEMPORAL CHANGES IN SSC FOR (C) NANOPHYTOPLANKTONIC FRACTION, AND (D) PICOPHYTOPLANKTONIC FRACTION. ^ASIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR, ^{A,B}SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR+WSF, AND ⁺SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO HUVBR. (MEANS + SD)..... 156

FIGURE 9. TEMPORAL CHANGES IN (A) TOTAL BACTERIAL ABUNDANCE, (B) HNA BACTERIAL ABUNDANCE, AND (C) LNA BACTERIAL ABUNDANCE. ^ASIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR, ^{A,B}SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR+WSF, AND ⁺SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO HUVBR. (MEANS + SD)..... 161

FIGURE 10. TEMPORAL CHANGES IN SSC FOR (A) HNA BACTERIA, AND (B) LNA BACTERIA, AND TEMPORAL CHANGES IN FLI FOR (C) HNA BACTERIA, AND (D) LNA BACTERIA. ^ASIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR, ^{A,B}SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR+WSF, AND ⁺SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO HUVBR. (MEANS + SD)..... 162

FIGURE 11. TEMPORAL CHANGES IN (A) BACTERIAL COLONY FORMING-UNIT (CFU) AS DETERMINED BY THE SPREAD PLATE METHOD ON MARINE AGAR (DIFCO), AND (B) CFU:TOTAL BACTERIAL ABUNDANCE RATIO. ^ASIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR, ^{A,B}SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR+WSF, AND ⁺SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO HUVBR. (MEANS + SD)..... 163

CHAPITRE 3

FIGURE 1. OUTLINE OF THE MICROCOSMS EMPLOYED, (A) VIEWED FROM THE TOP DESCRIBING THE GENERAL POSITION OF THE MESOCOSM STRUCTURE, AND (B) VIEWED FROM THE SIDE, DEMONSTRATING THE MICROCOSM POSITION INSIDE MESOCOSMS..... 192

FIGURE 2. MEAN INTEGRATED DAILY IRRADIANCES AT 313, 320, 340 AND 380 NM, AND PAR, FOR SUNNY DAYS JUST BELOW WATER SURFACE IN NUVBR AND HUVBR TREATMENTS..... 193

FIGURE 3. TEMPORAL CHANGES IN (A) NITRATE+NITRITE, AND (B) PHOSPHATE CONCENTRATIONS. ^ASIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS AND RELATIVE TO NATURAL CONDITIONS, AND ^{A,B}SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN NUVBR+TBT AND HUVBR+TBT TREATMENTS. (MEANS ± SD)..... 203

- FIGURE 4. TEMPORAL CHANGES IN CHL *a* CONCENTRATIONS, AS % DECREASE RELATIVE TO NATURAL CONDITIONS. *SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS AND RELATIVE TO NUVBR. (MEANS \pm SD)..... 205
- FIGURE 5. % DECREASE IN TOTAL ABUNDANCE OF PHYTOPLANKTON CELLS $<20 \mu\text{M}$ RELATIVE TO NUVBR TREATMENT. ^SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS AND RELATIVE TO NATURAL CONDITIONS, AND ^B SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN NUVBR+TBT AND HUVBR+TBT TREATMENTS. (MEANS \pm SD)..... 209
- FIGURE 6. TEMPORAL CHANGES IN FSC (AS CELL SIZE) OF (A) 1-3 μM CELLS, AND (B) 3-10 μM CELLS, AND TEMPORAL CHANGES IN SSC (AS CELL SHAPE) OF (C) 1-3 μM CELLS, AND (D) 3-10 μM CELLS. *SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN TBT-ADDED TREATMENTS AND NATURAL CONDITIONS. (MEANS \pm SD)..... 210
- FIGURE 7. % INHIBITION OF GROWTH RATES ($K; \text{D}^{-1}$) OF PHYTOPLANKTON CELLS $< 20 \mu\text{M}$, 1-3 μM AND 3-10 μM CELLS RELATIVE TO NATURAL CONDITIONS. (MEANS \pm SD), AND CALCULATED BETWEEN DAY 1 A.M. AND DAY 5 P.M. 211
- FIGURE 8. % STIMULATION OR INHIBITION OF (A) BACTERIAL ABUNDANCE, AND (B) BACTERIAL SPECIFIC ACTIVITY. ^SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS AND NATURAL CONDITIONS, AND ^A,^B SIGNIFICANT DIFFERENCES ($P < 0.05$) BETWEEN NUVBR+TBT AND HUVBR+TBT TREATMENTS. (MEANS \pm SD)..... 214
- FIGURE 9. (A) SCHEMATIC VIEW OF THE THYLAKOID MEMBRANE INTEGRITY REPRESENTING PHOTOSYSTEM II (PS II), CYTOCHROME B_6F (CYT B_6F), AND PHOTOSYSTEM I (PS I). THE PATH OF THE ELECTRONS FROM H_2O TO NADPH IS INDICATED, AS WELL AS THE PROTON TRANSPORT THROUGHOUT THE ATP SYNTHASE, AND (B) NEGATIVE ACTIONS OF TBT (\Leftarrow) AND UVBR (\longleftarrow) ON THIS THYLAKOID MEMBRANE. (SEE TEXT FOR EXPLANATION)..... 220

ANNEXE

- ANNEXE 1. % DE DIMINUTION DU RENDEMENT PHOTOSYNTHÉTIQUE F_v/F_m , COMPARATIVEMENT AU TRAITEMENT NUVBR POUR L'EXPÉRIENCE DE RIMOUSKI. (MOYENNES \pm DS). *DIFFERENCES SIGNIFICATIVES ENTRE LES TRAITEMENTS ET COMPARATIVEMENT AU TRAITEMENT NUVBR. (CHAPITRES I & III)..... 250

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

- TABLE 1. MEAN INTEGRATED DAILY IRRADIANCES AT 313, 320, 340 AND 380 NM, FOR SUNNY DAYS JUST BELOW THE WATER SURFACE IN NUVBR AND HUVBR TREATMENTS. 83
- TABLE 2. RELATIVE IRRADIANCE INCREASE IN HUVBR TREATMENT USING FOUR FLUORESCENT LIGHT TUBES COMPARED TO RELATIVE INCREASE ASSOCIATED WITH OZONE DEPLETION OVER ANTARCTICA. THE SPECTRAL IRRADIANCE WAS WEIGHTED WITH THE BWF FOR INHIBITION OF PHOTOSYNTHESIS IN THE TEMPERATE LATITUDE DIATOM *PHAEODACTYLUM* SP. (CULLEN ET AL. 1992) 84
- TABLE 3. COMPOUNDS IDENTIFIED IN THE INITIAL WSF FROM THE CRUDE OIL FORTIES BEFORE ADDITION IN MICROCOSMS 87
- TABLE 4. GROWTH RATES (K , D^{-1}) CALCULATED DURING THE EXPONENTIAL PHASE FOR ALL PHYTOPLANKTON ASSEMBLAGES. INHIBITION OF GROWTH RATE WAS ALSO CALCULATED AS THE % DECREASE FROM GROWTH RATE OBSERVED IN NUVBR TREATMENT FOR EACH PHYTOPLANKTON ASSEMBLAGE. (MEANS \pm SD). *SIGNIFICANT DIFFERENCES ($P < 0.05$) BETWEEN TREATMENTS AND RELATIVE TO NUVBR 97

CHAPITRE 2

- TABLE 1. DAILY IRRADIANCE JUST BELOW THE WATER SURFACE (I_0 , $\mu E\ CM^{-2}\ S^{-1}$ FOR PAR, AND $KJ\ M^{-2}\ NM^{-1}\ D^{-1}$ FOR UV IRRADIANCE), VERTICAL ATTENUATION COEFFICIENT (K_D , M^{-1}) AND MEAN DEPTH OF 1% LIGHT PENETRATION ($Z_{1\%}$, M), MEASURED IN NUVBR AND HUVBR MESOCOSMS. 141
- TABLE 2. SUMMARY RESULTS OF MANOVA FOR MAJOR PARAMETERS MEASURED DURING THE EXPERIMENT, SHOWING MAIN EFFECTS OF THE REPEATED MEASURE (TIME) AND THEIR INTERACTIONS WITH EACH INDIVIDUAL EFFECT (TIME \times UVBR,

TIME \times WSF, AND TIME \times UVBR \times WSF). *INDICATES SIGNIFICANCE FOR $0.01 < p \leq 0.05$, ** FOR $0.001 < p \leq 0.01$, AND *** FOR $p \leq 0.001$. NS: NO SIGNIFICANT 147

TABLE 3. FINAL PIGMENT CONCENTRATIONS ($\mu\text{g L}^{-1}$) IN THE FOUR TREATMENTS. PIGMENT TYPES ARE ABBREVIATED AS FOLLOW: FUCOXANTHIN (FUCO), ALLOXANTHIN (ALLO), CHLOROPHYLL *B* (CHL *B*), DIADINOXANTHIN (DD) DIATOXANTHIN (DT), AND β -CAROTENE (β -CAROTEN). CONCENTRAIONS IN TOTAL PHOTOPROTECTIVE CAROTENOID (PPCs) AND PHOTOSYNTHETIC CAROTENOID (PSCs) PIGMENTS AS WELL AS TOTAL CAROTENOIDS (CAROs) ARE ALSO PRESENTED. THEREAFTER, PIGMENT:CHL *A* RATIO WAS CALCULATED FOR EACH PIGMENT OR TYPE OF PIGMENT AND PRESENTED IN PARENTHESES WITH SIGNIFICANT DIFFERENCES IN BOLD. *ALGAL DIVISION/CLASSE IDENTIFIED IN THE PRESENT STUDY WITH THEIR CORRESPONDING PIGMENTS. (MEANS \pm SD)..... 154

TABLE 4. GROWTH RATES (K ; D^{-1}) CALCULATED BETWEEN DAY 1 AND DAY 5, FOR TOTAL CELLS $< 20 \mu\text{M}$, PICOPHYTOPLANKTON, AND NANOPHYTOPLANKTON CELLS. INHIBITION OF GROWTH RATE IS SHOWN AS % DECREASE FROM GROWTH RATE OBSERVED IN NUVBR TREATMENT FOR EACH PHYTOPLANKTON ASSEMBLAGE. ^ASIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR, ^{A,B}SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO NUVBR+WSF, AND ⁺SIGNIFICANT DIFFERENCES RELATIVE TO HUVBR. (MEANS \pm SD)..... 157

CHAPITRE 3

TABLE 1. SAMPLING TIME FOR THE DIFFERENT PARAMETERS MEASURED DURING THE 5-D EXPERIMENT 194

TABLE 2. UPPER TABLE PRESENTS THE DAILY INTEGRATED INCIDENT IRRADIANCE AT 313, 320, 340, AND 380 NM, AND PAR MEASURED OVER THE EXPERIMENTAL PERIOD USING A GUV RADIOMETER. APPARENT ATTENUATION COEFFICIENTS (K_D , M^{-1}) FOR THE SAME WAVELENGTHS AS DERIVED FROM IRRADIANCE DEPTH PROFILES IN THE MESOCOSMS AND THE CORRESPONDING DEPTH OF 1% LIGHT NEAR SURFACE IRRADIANCE (0 M) ARE PRESENTED IN THE LOWER TABLE 195

TABLE 3. PHOTOCHEMICAL YIELD VALUES, EXPRESSED AS % RELATIVE TO NUVBR TREATMENT, AND CALCULATED FROM THE FLUORESCENCE RATIO PARAMETERS $F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$. (MEANS \pm SD). *SIGNIFICANT DIFFERENCES ($p < 0.05$) WITH NUVBR. **SIGNIFICANT DIFFERENCE ($p < 0.05$) BETWEEN NUVBR+TBT AND HUVBR+TBT. N.S.: NO FLUORESCENCE SIGNAL RECORDED 206

LISTE DES ABBRÉVIATIONS ET ACRONYMES

CFC	:	Chlorofluorocarbones
Chl <i>a</i>	:	Chlorophylle <i>a</i>
Cl·	:	Atome de chlore réactif
CFU	:	Colony-forming unit
CO₂	:	Dioxyde de carbone
DBT	:	Dibutylétain
DU	:	Unité Dobson
FL1	:	Indice de l'activité bactérienne
FSC	:	Indice de taille (diffusion aux petits angles , 1-19°)
<i>F_v</i>	:	Fluorescence variable
<i>F_m</i>	:	Fluorescence maximale
<i>F_v/F_m</i>	:	Efficacité photosynthétique du photosystème II
HAPs	:	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HNA	:	High nucleic acid
HOMO	:	Higher Occupied Molecular Orbital
K_d(λ)	:	Coefficient d'atténuation diffuse à la longueur d'onde λ
LNA	:	Low nucleic acid
LUMO	:	Lower Unoccupied Molecular Orbital
MBT	:	Monobutylétain
PAR	:	Photosynthetically Available Radiation
¹O₂	:	Oxygène singulet
O₃	:	Ozone (molécules)
O·	:	Oxygène atomique
PS I	:	Photosystème I
PS II	:	Photosystème II
Φ	:	Rendement quantique d'une réaction photochimique
RUV-A	:	Rayonnement ultraviolet –A
RUV-B	:	Rayonnement ultraviolet –B
RUV-C	:	Rayonnement ultraviolet –C
RUV	:	Rayonnement ultraviolet

SSC	:	Indice de structure (diffusion aux grands angles , 73-109°)
TBT	:	Tributylétain
WSF	:	Water Soluble Fraction

INTRODUCTION GÉNÉRALE

CONCEPT D'INTERACTIONS ET DE STRESS MULTIPLES

Depuis plusieurs dizaines d'années, les pharmacologues et toxicologues ont démontré que les interactions entre plusieurs drogues entraînaient de sérieuses conséquences chez les patients sous multi-thérapies. Dans ce cadre conceptuel, trois classes d'interactions ont été définies (Calabrese 1991, Fig. 1):

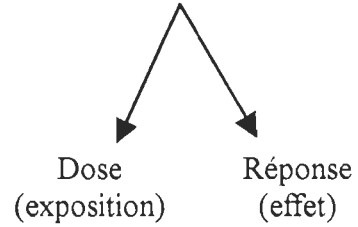
- ✓ Additive : l'effet d'une combinaison de deux stress est simplement égal à la somme des effets individuels de chaque stress donné séparément.
- ✓ Synergique : l'effet de la combinaison des deux stress est plus grand que la somme des effets individuels.
- ✓ Antagoniste : l'effet de la combinaison des deux stress est plus petit que la somme des effets individuels.

De plus, les composés chimiques peuvent également interagir avec des facteurs naturels de stress de telle sorte que cela conduit à des effets non prévisibles par les approches de recherche traditionnelle basées sur une seule variable. Dans l'environnement aquatique, les organismes sont rarement exposés à un seul stress à la fois, que ce dernier soit d'origine naturelle ou anthropique. En effet, un certain nombre de paramètres du milieu tels que la température, les conditions hydrodynamiques et l'environnement lumineux vont

Figure 1. Présentation des trois classes d'interaction possibles entre deux agents (chimiques et/ou naturels), selon Calabrese (1991).

Antagonisme
- la réponse est moindre que celle attendue -

Additivité
- la réponse est telle qu'attendue -



Synergie
- la réponse est plus grande que celle attendue -

Co-synergie
(2 agents augmentent la toxicité l'un de l'autre)

Potentialisation
(seul 1 agent affecte la toxicité de l'autre, tout en étant lui, non toxique)

Coalition
(2 agents sans toxicité apparente conduisent à un effet toxique)

influencer le degré de toxicité d'un contaminant sur la communauté aquatique en place. Ainsi, tout comme dans le cadre conceptuel de la toxicologie, un contaminant et un facteur naturel de stress vont pouvoir interagir de manière additive, synergique ou antagoniste.

COUCHE D'OZONE ET RAYONNEMENT ULTRAVIOLET-B

L'atmosphère qui entoure la Terre joue un rôle essentiel dans l'énergie solaire que reçoit celle-ci, en réfléchissant ou en absorbant les différents rayonnements solaires. Certaines couches atmosphériques ont ainsi eu des effets déterminants dans l'évolution de la biosphère et conservent de nos jours un rôle protecteur pour la vie (Cockell 1998). Au niveau de la stratosphère (entre 10 et 50 km d'altitude atmosphérique), le rayonnement solaire est suffisamment énergétique pour dissocier la liaison O=O de l'oxygène moléculaire O₂. L'oxygène atomique O· se recombine alors très rapidement avec l'oxygène moléculaire pour former des molécules d'ozone (O₃) (Fig. 2A). De même, ces molécules d'ozone peuvent être détruites par photolyse directe ou recombinaison. La stratosphère se caractérise dès lors par l'existence d'une couche d'ozone maintenue dans un équilibre dynamique entre production photochimique, photolyse et recombinaison chimique.

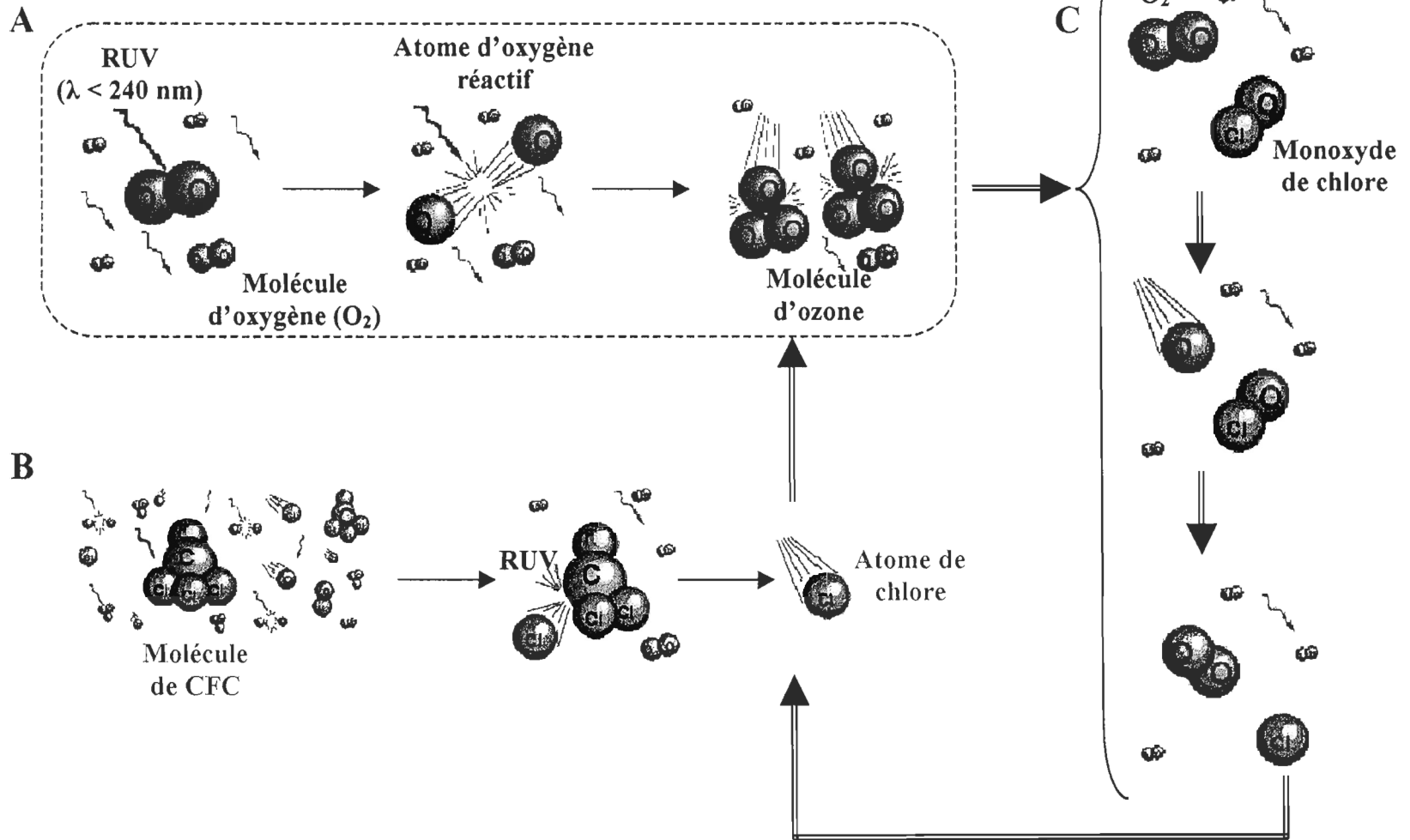
Cette couche d'ozone représente fort peu de matière et son épaisseur, au-dessus d'un point de la surface terrestre, est évaluée en unité Dobson (DU). Tout l'ozone atmosphérique ramené au niveau du sol, dans des conditions de température et de pression qui y règnent,

occuperait une épaisseur d'environ 3 mm, soit 300 DU. Dans la stratosphère, l'ozone forme ainsi une "couche", d'épaisseur minimale aux tropiques (~ 260 DU) et plus dense au fur et à mesure que l'on s'éloigne vers les pôles.

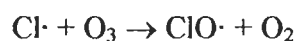
La variabilité naturelle de la couche d'ozone est non seulement fonction de la latitude mais également de la saison pour une même latitude, de l'altitude et de l'angle solaire.

La présence de cette couche d'ozone est primordiale car elle absorbe une partie du rayonnement solaire et plus particulièrement dans la région du rayonnement ultraviolet (RUV). Ce RUV se divise classiquement en trois bandes distinctes : le rayonnement ultraviolet-A (RUV-A : 320-400 nm); le rayonnement ultraviolet-B (RUV-B : 280-320 nm) et le rayonnement ultraviolet-C (RUV-C : 200-280 nm). Les RUV-C sont entièrement filtrés par l'ozone aux environs de 35 km d'altitude. La majorité du RUV-A, quant à elle, atteint la surface de la Terre, n'étant pas altérée par la couche d'ozone. Par contre, cette couche d'ozone stratosphérique a pour principale caractéristique d'absorber en partie le RUV-B. Bien que ce dernier représente moins de 1% de l'énergie solaire totale atteignant la surface de la Terre (Cutchis 1974), il joue un rôle déterminant dans les biotopes aquatiques et terrestres en raison de l'énergie chimique élevée qu'il renferme.

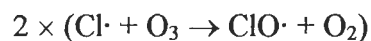
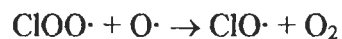
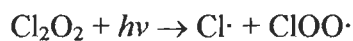
Figure 2. Représentation schématique de (A) la formation photochimique de molécules d'ozone (O_3), (B) de l'influence des chlorofluorocarbones (CFCs) dans la production d'atomes de chlore réactifs ($Cl\cdot$) après photodissociation par le rayonnement solaire ultraviolet, et (C) destruction des molécules d'ozone par les atomes de chlore ($Cl\cdot + O_3 \rightarrow ClO\cdot + O_2$) et remise en circulation d'atomes de chlore réactifs dans le processus de destruction de la couche d'ozone ($ClO\cdot + O\cdot \rightarrow O_2 + Cl\cdot \cup Cl\cdot + O_3 \rightarrow ClO\cdot + O_2 \cup$ etc.).



Or, depuis les années 70 et 80 (Molina & Rowland 1974, Farman et al. 1985), on assiste à une réduction dramatique de l'épaisseur de la couche d'ozone avec l'apparition d'un "trou" d'ozone au dessus de l'Antarctique, enregistré au début de chaque printemps austral. Les chlorofluorocarbones (CFCs) demeurent la principale cause de cet appauvrissement de la couche d'ozone stratosphérique (Rowland 1989, Anderson et al. 1991). En effet, une fois émis, ces composés anthropiques s'élèvent progressivement dans l'atmosphère jusqu'à atteindre la stratosphère où le RUV solaire est suffisamment fort pour les photodissocier et ainsi relâcher des atomes de chlore réactifs (Fig. 2B). Associés à des conditions atmosphériques particulières (nuages stratosphériques polaires, vortex polaire et basses températures stratosphériques), ces atomes de chlore vont alors pouvoir réagir avec les molécules d'ozone et conduire à leur destruction (Fig. 2C). Ainsi, dès qu'un atome de chlore est libéré, l'ozone réagit avec lui pour former le monoxyde de chlore :



Ce radical peut alors donner lieu à d'autres réactions selon la séquence suivante :



Donnant la destruction nette : $2\text{O}_3 \rightarrow 3\text{O}_2$

On estime qu'un atome de chlore libéré peut réduire environ 100 000 molécules d'ozone avant d'être éliminé sous forme de chlorure d'hydrogène (HCl) par précipitation vers la troposphère (Rowland 1989).

Ce "trou" d'ozone devient de plus en plus profond, persistant et étendu en superficie. Vers la fin des années 90, le "trou" dans la couche d'ozone de l'Antarctique a atteint des dimensions records, et au printemps 2001, il dépassait 25 millions de km^2 , avec des diminutions des valeurs d'ozone atteignant 60% (<http://www.theozonehole.com>) et ces limites débordent maintenant le continent Antarctique pour atteindre l'extrême sud de l'Amérique du Sud. Ce "trou" d'ozone s'observe également au-dessus du pôle Nord, mais dans une moindre mesure car les températures y sont moins rigoureuses et le vortex polaire moins intense (circulation atmosphérique plus instable qu'en Antarctique) (Rex et al. 1997). Ainsi, en mars 1996 et 1997, les valeurs polaires étaient, respectivement, de 30 et 45 % inférieures à la normale (Müller et al. 1997). Au cours de ces deux années, la configuration des vents dans la stratosphère arctique était inhabituelle, ressemblant à ce qui est normalement observé dans l'Antarctique. Plus récemment, il a été reporté des pertes cumulatives d'ozone de plus de 60% pour l'hiver 1999/2000 (THESEO 2000). Certains modèles prédisent même la formation d'un "trou" d'ozone au-dessus de l'Arctique, comparable à celui observé dans l'hémisphère Sud, avec une déplétion locale proche de 100% dans la basse stratosphère (Austin et al. 1992). De plus un modèle récent (Rex et al.

2004) met en relation le refroidissement de la stratosphère arctique et les changements climatiques, avec une diminution de la couche d'ozone trois fois plus importante que ne le prédisaient les modèles antérieurs.

Ainsi, la conséquence directe de l'appauvrissement de la couche d'ozone, et cela quelle que soit la région du globe terrestre, est une augmentation du RUV-B, conduisant à un changement du ratio UV-B / [UV-A + PAR (Photosynthetically Available Radiation ou lumière visible : 400-700 nm)] (Cutchis 1974), à savoir une modification de la balance spectrale avec un déplacement du spectre solaire vers les longueurs d'onde plus courtes, plus énergétiques ayant le potentiel d'induire d'importantes réactions photochimiques dans les environnements aquatiques (Whitehead et al. 2000).

RÉACTIONS PHOTOCIMIQUES ET RAYONNEMENT ULTRAVIOLET-B

La modification de la balance spectrale du spectre solaire se répercute à la surface des océans, avec une pénétration du RUV-B dans la colonne d'eau à des profondeurs écologiquement significatives (Boelen et al. 1999, Vasseur et al. 2003). Ainsi, compte tenu de l'importance énergétique de ces photons, le RUV-B a le potentiel d'endommager directement les molécules, aussi bien biologiques (i.e. ADN, protéines) qu'anthropiques (contaminants) capables de l'absorber, *via* des réactions photochimiques.

Une telle réaction chimique est initiée par l'absorption d'un photon par une molécule. Il existe deux lois fondamentales en photochimie (Mousseron-Canet & Mani, 1969). La première stipule que seule la lumière absorbée par une molécule peut produire des changements photochimiques dans la molécule. Ainsi, en raison de ses caractéristiques énergétiques, le RUV-B agit au niveau moléculaire par action photochimique, après absorption, et une grande partie de ces effets au niveau de l'écosystème est intimement liée à des effets sur la chimie organique (Cockell 1998). Plusieurs des liaisons chimiques qui constituent les molécules d'origine biologique, ou non, ont des caractéristiques d'absorption variables du rayonnement ultraviolet. Les systèmes d'électrons- π constituent les configurations électroniques absorbant le plus dans l'UV, ce qui confère à de nombreuses molécules une forte susceptibilité d'absorption du RUV, comme en particulier les acides nucléiques, les protéines et les lipides (Cockell 1998), ainsi que certains contaminants comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs; Dabestani & Ivanov 1999).

La deuxième loi en photochimie stipule quant à elle qu'une molécule est activée pour chaque photon absorbé dans le système considéré. Cette activation se définit par le passage de la molécule de son état fondamental (i.e. état normal de la molécule dit singulet possédant une paire d'électrons et correspondant à une énergie minimale) à un état excité d'énergie plus élevée (Fig. 3A). Un électron passe alors d'une orbitale occupée la plus externe (HOMO: Higher Occupied Molecular Orbital) vers une orbitale la plus basse inoccupée (LUMO: Lower Unoccupied Molecular Orbital) (Fig. 3B). Cette molécule

électroniquement excitée (ou activée) doit alors dissiper cette énergie en excès (Larson & Berenbaum 1988) afin de retourner à son état fondamental (Zepp & Cline 1977). La majorité des états excités perdent cette énergie électronique en excès selon trois voies principales (Fig. 3A):

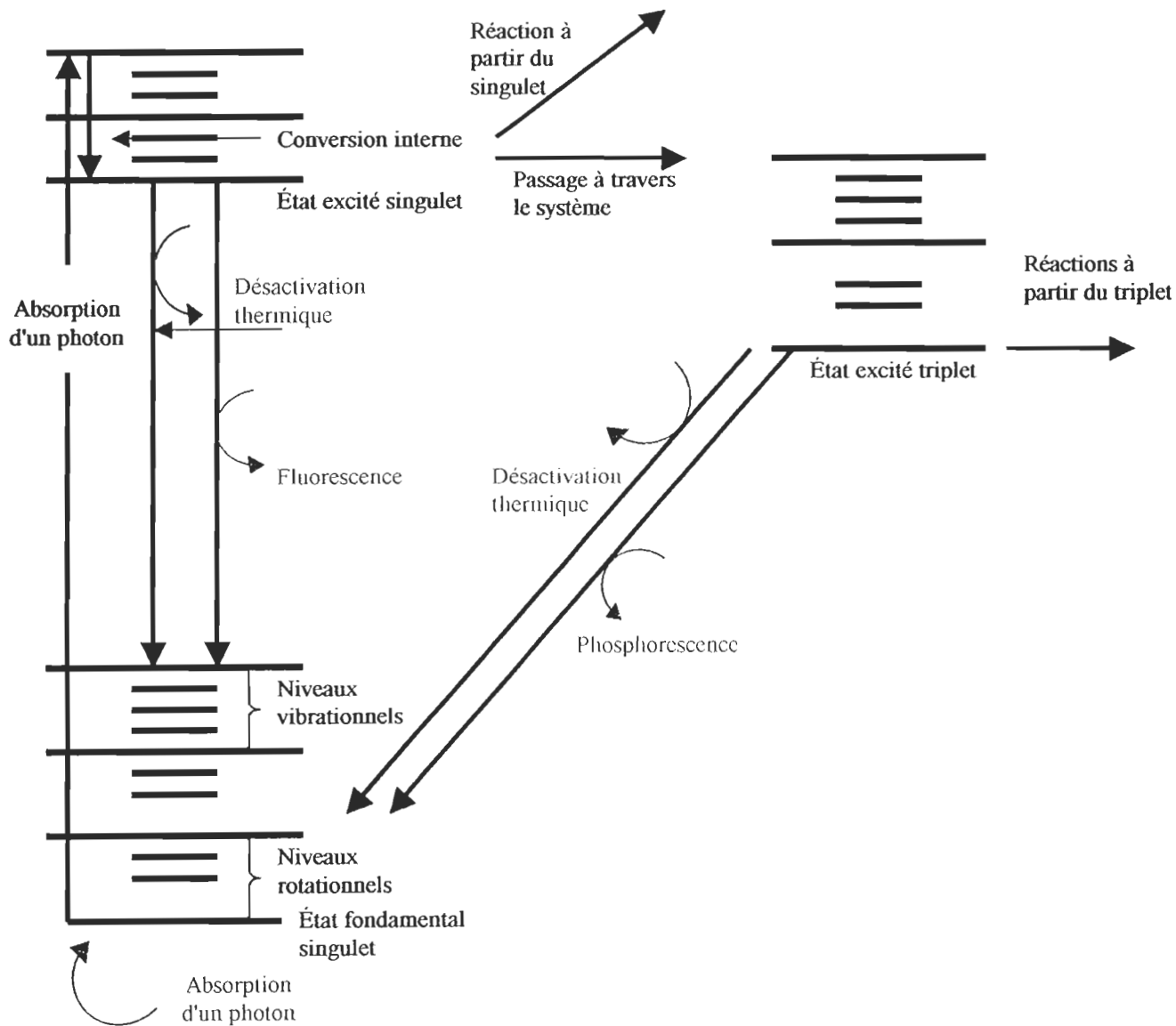
- ✓ Reconversion thermique via une émission de chaleur;
- ✓ Fluorescence avec émission d'un photon d'énergie inférieure à celle du photon absorbé;
- ✓ Conversion interne avec transformation de l'état singulet en état excité triplet de plus faible énergie, sans électrons appariés.

La proportion de photons absorbés qui conduit à ces processus est appelée rendement quantique Φ du processus considéré :

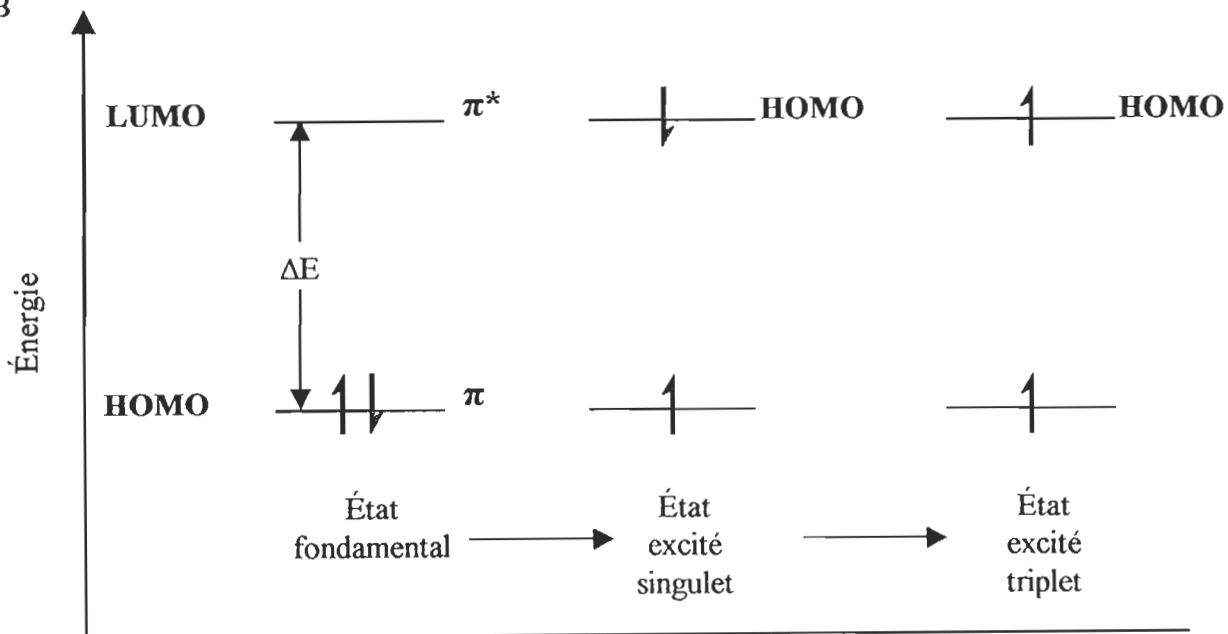
$$\Phi = \frac{\text{Nombre de molécules (M) réactives ou produites}}{\text{Nombre de photons absorbés par (M)}}$$

Figure 3. Diagramme schématique (A) de l'excitation d'une molécule due à l'absorption d'un photon et les différentes voies de retour à l'état fondamental, et (B) du concept d'HOMO-LUMO.

A



B



Ainsi, quand une molécule absorbe un photon, la réaction résultante peut être une photodégradation directe ayant un rendement quantique maximum de 1 (i.e. 100% des molécules absorbant un photon produisent la même réaction). L'absorption d'un photon par une molécule conduit alors au clivage d'une seule liaison et produit ainsi un maximum de deux nouvelles molécules (i.e. photoproduits). Cette photodégradation directe (i.e. photo-oxydation et photolyse) se traduit donc par une modification structurale de la molécule originelle avec la formation de photoproduits. Cette photodégradation peut également être indirecte, c'est à dire qu'il y a formation de nouvelles espèces chimiques réactives capables d'interagir avec d'autres molécules différentes (Crosby 1994), et le rendement quantique peut alors être supérieur à 1. On parle ici de processus photochimiques secondaires, parmi lesquels on trouve le processus de photosensibilisation. Ce processus se divise en deux mécanismes distincts, dépendamment de la nature de la réaction primaire (Foote 1991) (Fig. 4):

- ✓ Le mécanisme de type-I implique une interaction directe de l'état excité du photosensibilisateur avec le substrat cible comme événement majeur.

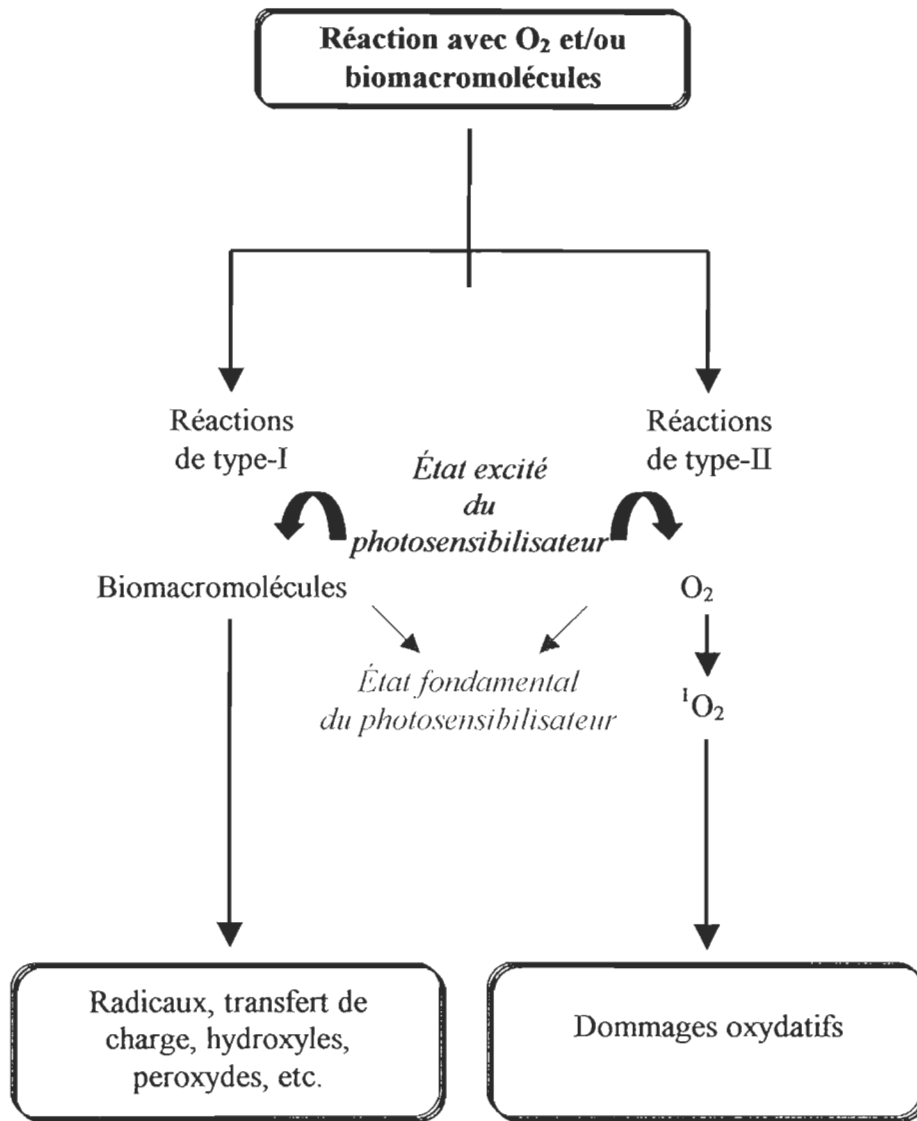
- ✓ Le mécanisme de type-II implique le transfert de l'énergie de l'état excité du photosensibilisateur à l'oxygène moléculaire comme réaction principale. Cela conduit dès lors à la formation d'oxygène singulet excité pouvant induire des changements chimiques au niveau des biomolécules essentielles telles que les acides nucléiques et les protéines.

Ces réactions photochimiques peuvent intervenir aussi bien en eau douce qu'en eau de mer, dans la micro-couche de surface, sur les matières en suspension dans la colonne d'eau (Whitehead 2000) et probablement à la surface des sédiments dans les environnements peu profonds. Ces réactions peuvent aussi bien abaisser les concentrations environnementales des contaminants et des composés naturellement présents dans le milieu que conduire à la formation de photoproduits pouvant être persistants et toxiques.

Ces réactions peuvent également altérer le caractère lipophile et, par conséquent, la bioconcentration des composés anthropiques (Crosby 1984). Le RUV peut également convertir des formes minérales non réactives et non disponibles en formes solubles et biodisponibles.

Un grand nombre de réactions photochimiques sont ainsi influencées de manière significative par le RUV-B. De telles réactions peuvent alors (i) affecter la biodisponibilité de certains métaux traces essentiels tels que le fer ou le manganèse (Waite et al. 1994, Powell & Wilson-Finelli 2003), (ii) générer des espèces chimiques de transition telles que des peroxydes, des ions superoxydes et des radicaux hydroxyles, potentiellement néfastes envers les organismes aquatiques (Kieber et al. 2003), (iii) causer la dégradation des substances humiques en composés organiques de plus faible poids moléculaire (Wetzel et al. 1995), et/ou (iv) libérer des micro-nutriments à partir des constituants organiques dissous (Bushaw et al. 1996).

Figure 4. Diagramme schématique des mécanismes de type-I et de type-II impliqués dans le processus de photosensibilisation : interactions du photosensibilisateur avec l'oxygène et/ou des biomacromolécules et dommages conséquents.



COMMUNAUTÉS PLANCTONIQUES ET RAYONNEMENT ULTRAVIOLET-B

Phytoplancton et rayonnement ultraviolet-B

Différentes réactions photochimiques jouent un rôle important pour toute forme de vie. Ainsi, la photosynthèse, qui est le processus à la base d'une majorité des réseaux trophiques, consiste en l'absorption de l'énergie lumineuse pour produire de la matière organique. Pour cela, les organismes phytoplanctoniques dépendent de l'énergie solaire et sont donc restreints à la couche photique de la colonne d'eau où ils sont exposés aussi bien au PAR mais également aux niveaux élevés de rayonnement de courtes longueurs d'onde, en raison du déplacement spectral occasionné par la diminution de la couche d'ozone. Il est maintenant clairement démontré que le RUV-B engendre des effets délétères sur ces organismes photosynthétiques (Fig. 5) et constitue de ce fait un facteur écologique significatif important (Booth et al. 1997, Vasseur et al. 2003), ces producteurs primaires constituant la base du réseau trophique aquatique.

Ainsi, le RUV-B va affecter des processus cibles tels que : la réplication de l'ADN, la division et la croissance cellulaires, la photosynthèse (système de transport d'électrons, centres réactionnels du photosystème II, stabilité des pigments), l'assimilation d'éléments nutritifs, la mobilité, l'orientation, et cela après absorption des longueurs d'onde spécifiques

et dissipation subséquente de cette énergie par des réactions photochimiques (Kieber 2000, Vernet 2000).

De toutes les composantes cellulaires, l'ADN et l'ARN ont les coefficients d'absorption les plus élevés aux courtes longueurs d'onde UV; ces molécules sont donc tout particulièrement sensibles au RUV-B (Vincent & Neale 2000). Les dommages à l'ADN ont été ainsi observés chez les microalgues soumises à une exposition au RUV-B (Buma et al. 1996a), avec dimérisation des bases pyrimidines (thymine et cytosine) et formation d'adduits à l'ADN. Ces dimères bloquent l'action de l'ADN polymérase et empêchent ainsi la réplication du génome (Setlow et al. 1963, Hada et al. 1998).

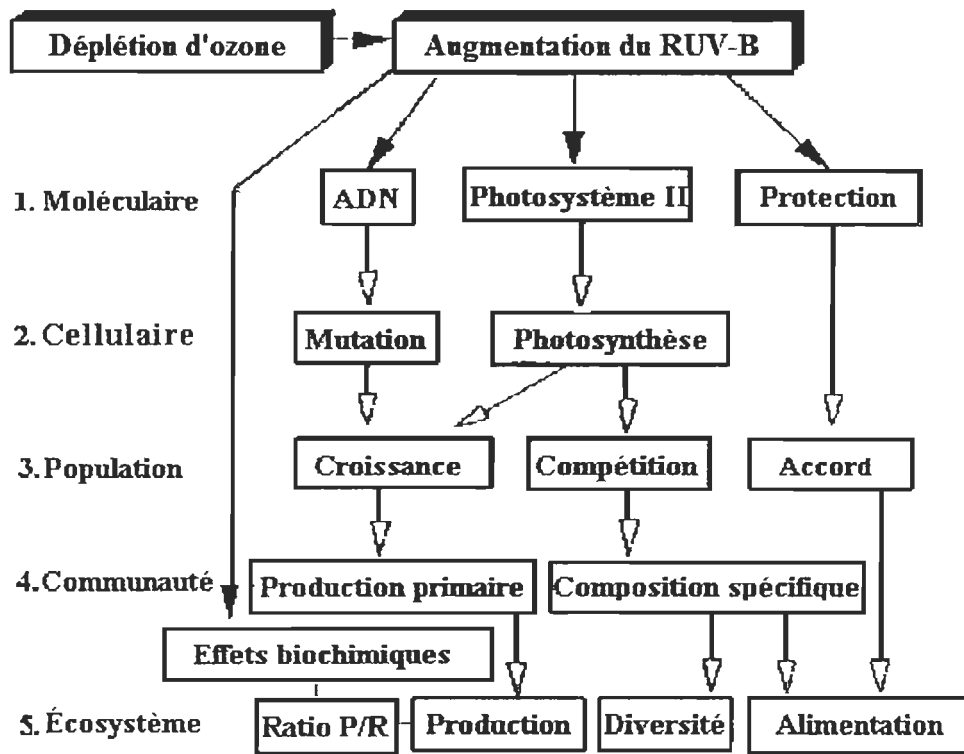
Une des conséquences observées de ces dommages à l'ADN est l'augmentation de la taille cellulaire (i.e. absence de division cellulaire) avec l'augmentation subséquente de la teneur en pigments et en protéines (Karentz et al. 1991, Behrenfeld et al. 1992, Buma et al. 1996b, Mostajir et al. 1999b). Mostajir et al. (1999b) ont avancé l'hypothèse qu'une augmentation du volume cellulaire pourrait être due à la perturbation du cycle cellulaire sous RUV-B augmenté.

Les dommages à l'ADN peuvent également causer l'inhibition de la réplication de l'ADN, condition pré-requise pour la division cellulaire. Ainsi, Buma et al. (1996b) n'ont observé aucune division nucléaire chez les cellules présentant une augmentation de leur volume. En parallèle, ces auteurs ont observé une augmentation de la teneur en protéines

qui peut être associée à une augmentation du nombre de chloroplastes, dont la division n'implique pas l'ADN nucléaire. Ces résultats impliquent que le RUV-B a un fort impact sur l'ADN nucléaire par rapport à l'ADN des chloroplastes; l'ADN des chloroplastes serait probablement protégé par les pigments environnants. À plus fortes doses de RUV-B, ces auteurs n'ont cependant observé aucun accroissement de la taille cellulaire et des teneurs en composés cellulaires. Comme Döhler (1985), ils ont observé en revanche une inhibition complète de la croissance.

Karentz et al. (1991) ont observé une diminution interspécifique de la sensibilité au RUV-B avec l'augmentation du volume cellulaire. Ils ont ainsi suggéré que cette augmentation du volume pourrait protéger l'ADN en augmentant la distance à parcourir par le RUV-B à travers la cellule. Le RUV-B peut donc inhiber les étapes du cycle cellulaire (Buma et al. 1996b), conduisant à une croissance continue de la cellule sans division (Behrenfeld et al. 1992).

Figure 5. Influences du RUV-B, du niveau moléculaire au niveau des communautés, sur les organismes photosynthétiques dans l'environnement aquatique. (Adapté de Vincent & Roy 1993)



Une deuxième cause peut être avancée en ce qui concerne cet accroissement du volume cellulaire, à savoir un changement de la capacité photosynthétique (Mostajir et al. 1999b). En effet, l'inhibition de la photosynthèse de ces organismes phytoplanctoniques est une des réponses les plus sensibles au RUV-B (Vincent & Neale 2000). De nombreuses études ont montré l'importance de ce dommage, aussi bien sur des espèces mises en culture que sur des populations naturelles (Worrest et al. 1978, Lorenzen 1979, Smith et al. 1980, Worrest et al. 1981a, b, Jokiel & York 1984, Döhler 1985, Cullen & Lesser 1991, Helbling et al. 1992, Behrenfeld et al. 1993a, b, Schofield et al. 1995). La photoinhibition par le RUV est fonction de la longueur d'onde, les plus courtes entraînant de plus grands dommages par unité de dose que les plus grandes longueurs d'onde (Behrenfeld et al. 1993b). Sachant qu'une inhibition de la photosynthèse implique une réduction de la production primaire, le RUV-B peut ainsi conduire à une diminution de 6 à 12% de la productivité photosynthétique (Helbling et al. 1992). Le RUV-B peut interférer avec plusieurs aspects du processus de photosynthèse : inactivation du photosystème II (PS II), dysfonctionnement du transport d'électrons, destruction des pigments et des protéines (protéine D1) et dommages aux membranes (Döhler 1984, Schofield et al. 1995). De plus, le RUV-B peut conduire à des variations dans le réarrangement de l'appareil photosynthétique membranaire. Ceci peut alors inhiber plusieurs processus photochimiques et biochimiques (Döhler 1984).

Une diminution de la capacité photosynthétique va alors se répercuter sur l'émission de fluorescence de la chlorophylle *a* (Estrada et al. 1996). La fluorescence est un processus par

lequel une partie de l'énergie d'excitation est perdue par un processus radiatif au lieu d'être utilisée pour les réactions photochimiques. Ainsi, l'énergie émise par les pigments photosynthétiques sous forme de fluorescence est perdue (elle n'est plus disponible pour la conversion de l'énergie lumineuse en énergie biochimique). Après une courte exposition au RUV-B une forte augmentation de la fluorescence peut être observée (Häder & Worrest 1991), indiquant que l'énergie d'excitation ne peut être utilisée efficacement par l'appareil photosynthétique. Après une exposition à plus long terme, la fluorescence diminue; les pigments absorbants étant progressivement détruits par le rayonnement.

Le RUV-B perturbe l'assimilation des éléments nutritifs (Fauchot et al. 2000, Fouilland et al. 2003), et plus particulièrement celle de l'azote. Or, la fixation de ce composé est une condition pré-requise pour la croissance car il est nécessaire à la synthèse des protéines. Suite à l'inactivation de l'activité du PS II, l'assimilation d'azote, ainsi que la fixation de CO₂ peuvent être affectées par l'apport réduit en ATP et en ferredoxyne après une exposition au RUV-B (Döhler 1985). De plus, l'enzyme clé pour l'assimilation de l'azote est la nitrogenase qui est activée par la lumière et inactivée par le RUV-B (Häder & Worrest 1991). Des expériences en laboratoire sur des cultures semi-continues de diatomées marines ont mis en évidence qu'une exposition à long terme au RUV-B diminuait la prise de nitrate (Döhler & Biermann 1987).

Les estimations de l'importance de la composante UV-B du spectre solaire sur la photoinhibition sont difficiles du fait (i) de la difficulté à extrapoler les résultats obtenus en

laboratoire à l'environnement naturel, (ii) du mélange vertical (Cullen & Lewis 1988), (iii) de l'existence de processus de photoadaptation et de photoréparation qui mitigent les effets à plus long terme du RUV-B (Roy 2000), (iv) de différences interspécifiques dans la tolérance au RUV-B (Worrest et al. 1981b, Jokiel & York 1984), et (v) de l'utilisation de doses de RUV-B augmentées qui excèdent de loin les doses attendues suite à la réduction des concentrations en ozone stratosphérique. Smith et al. (1980) ont réalisé les premières mesures de la photoinhibition sur des assemblages phytoplanctoniques marins naturels exposés à la fois au RUV-B ambiant et à un RUV-B intensifié. Ils ont ainsi mis en évidence la variabilité latitudinale de la sensibilité au RUV-B. Dans le même cadre d'étude, Behrenfeld et al. (1993b) ont également souligné une plus grande variabilité de la réponse en fonction de la dose aux hautes latitudes. Ce résultat peut être interprété comme une importante différence interspécifique de la tolérance des populations échantillonnées, vis à vis du RUV-B. Pour des latitudes plus basses, dans la gyre du Pacifique Sud, cette réponse est plutôt constante, du fait des caractéristiques océanographiques et des conditions de lumière de cet environnement marin (faibles taux de mélange vertical, forte stratification, eau optiquement claire et RUV-B solaire élevé). En effet, un modèle de l'effet du mélange vertical sur les réponses photoadaptatives (Cullen & Lewis 1988) indique que lorsque le processus de photoadaptation est plus rapide que le mélange vertical, les populations phytoplanctoniques ajusteraient, d'un point de vue physiologique, leurs positions verticales dans la colonne d'eau par rapport aux paramètres physiques. Ainsi, la photoadaptation peut être partiellement responsable de cette réponse phytoplanctonique relativement constante, en fonction de la dose de RUV-B.

Les différences de sensibilité indiquent que le RUV-B est une variable active dans la définition des niches écologiques et que des changements d'intensité du RUV-B peuvent conduire à un changement de la composition spécifique des communautés phytoplanctoniques (Mostajir et al. 1999a).

Toutefois, plusieurs mécanismes de protection contre le RUV-B mitigent les effets délétères du RUV-B : la photoréaction (i.e. réparations enzymatiques), qui corrige les dommages causés par le RUV-B, *via* l'exposition au RUV-A ou au rayonnement de longueurs d'onde plus grandes. Ce phénomène est observable chez la plupart des formes de vie. La réparation par excision constitue un autre processus de réparation, par lequel des enzymes spécifiques excisent ou enlèvent des dimères et remplacent la portion clivée avec l'ADN répliqué. D'autres mécanismes de protection impliquent la production de composés "écran" tels que les MAAs (mycosporine-like amino acids), capables d'absorber le RUV-B et donc de jouer un rôle photoprotecteur (Roy 2000).

Cependant, l'existence de ces mécanismes de protection et de réparation n'implique pas nécessairement qu'il n'y a aucun effet négatif. Même si une réduction nette n'est pas détectée au niveau de la photosynthèse sur de longues périodes de temps, les ressources énergétiques nécessaires à la re-synthèse des protéines et/ou des pigments endommagés peuvent représenter une perte métabolique nette, affectant potentiellement la santé des cellules et leur survie à long terme (Cullen & Neale 1994). Par exemple, le processus de rétablissement nécessaire pour la synthèse de la protéine D1 du PS II peut représenter un

coût énergétique important, jusqu'à 10% de la synthèse totale nette de protéines (Raven & Samuelsson 1986).

Bactérioplancton, réseaux trophiques et rayonnement ultraviolet-B

Au sein des écosystèmes aquatiques, les bactéries représentent une source trophique importante dans la chaîne alimentaire pour les protistes et les métazoaires (Cho & Azam 1988). Elles sont également responsables de 50%, voire plus, du recyclage de la production primaire (Azam et al. 1983), jouant ainsi un rôle pivot dans le recyclage global du carbone. Cependant, les bactéries sont susceptibles d'être parmi les organismes planctoniques les plus sensibles au RUV-B, en raison de leur petite taille et de l'absence de pigments agissant comme écran protecteur (Vincent & Roy 1993, Müller-Niklas et al. 1995, Sommaruga et al. 1999).

Il a été démontré que le RUV-B ambiant peut inhiber jusqu'à 50% la réplication de l'ADN bactérien et les activités enzymatiques (Herndl et al. 1993). De plus, ces auteurs ont observé que les bactéries au sein de la couche euphotique et celles présentes plus en profondeur montraient la même sensibilité aux effets du RUV-B, suggérant qu'il n'y a aucune adaptation à ce type de rayonnement. Müller-Niklas et al. (1995) ont également observé des diminutions importantes dans les abondances des cellules, les taux de production, et les activités enzymatiques extracellulaires, responsables du clivage de la matière organique. Une étude similaire réalisée par Aas et al. (1996) a corroboré l'idée de

la vulnérabilité extrême du bactérioplancton au RUV-B. Les résultats de cette étude ont tout particulièrement souligné que l'inhibition de l'activité bactérienne était moins importante en présence de phytoplancton qu'en son absence; l'absence de cette composante entraînant une baisse significative des apports en substrats de croissance utilisés par les bactéries. En effet, les cellules phytoplanctoniques soumises à un stress physiologique vont exsuder un pourcentage plus important de carbone fixé (Wood et al. 1992, Malinsky-Rushansky & Legrand 1996), fournissant alors plus de substrat disponible pour les bactéries hétérotrophes. Le métabolisme bactérien est donc étroitement lié à la production primaire. Par conséquent, l'activité bactérienne est plus importante dans la couche supérieure mélangée des océans où la pénétration du RUV-B est suffisante pour influencer la croissance bactérienne (Herndl et al. 1993). Ces résultats montrent qu'il est important de considérer l'interaction entre la quantité de nourriture disponible et le RUV-B afin de déterminer l'effet net de ce rayonnement sur les bactéries (Chatila et al. 2001).

En effet, outre les effets directs négatifs sur la composante bactérienne des écosystèmes aquatiques, le RUV-B peut stimuler de manière indirecte la production bactérienne en augmentant la biodisponibilité de la matière organique dissoute (MOD) récalcitrante *via* des processus de photodégradation (Moran & Zepp 1997, De Lange et al. 2003). De tels processus consistent à transformer des molécules de poids moléculaires élevés en molécules de plus faibles poids moléculaires (Kieber et al. 1989). Certains de ces photoproduits sont des composés inorganiques (i.e. carbonates formant le carbone inorganique dissous : CID) et correspondent à la minéralisation photochimique directe de la

MOD. D'autres photoproduits sont des molécules organiques ayant une plus grande biodisponibilité (Kieber et al. 1989) et pouvant compenser une partie de l'inhibition due aux effets directs du RUV-B (Lindell et al. 1995). Mais ces effets positifs peuvent également être contrebalancés par la présence d'espèces réactives d'oxygène (ROS) suite à l'activité photochimique du RUV-B sur la MOD. Ainsi, Scully et al. (2003) ont démontré que les activités photochimiques et microbiennes n'agissent pas seulement de concert au cours de la dégradation de la MOD, mais qu'elles peuvent également entrer en compétition pour l'utilisation du substrat organique. Ceci démontre la complexité avec laquelle les réactions photochimiques affectent l'activité hétérotrophique bactérienne.

Or, il faut savoir que la formation de MOD dans la zone euphotique représente un réservoir de carbone important sur Terre (Hedges 1992) et que sa dégradation photochimique est une étape "limitante" dans la séquestration en profondeur du carbone océanique (Kieber et al. 1989, Mopper et al. 1991). Donc, des changements dans l'activité bactérienne et photochimique suite à une exposition à des niveaux plus élevés de RUV-B pourraient affecter le cycle global du carbone et des éléments nutritifs disponibles pour les communautés phytoplanctoniques.

Les interactions entre les bactéries et les cellules phytoplanctoniques sont complexes et doivent également tenir compte des brouteurs qui affectent la structure et la dynamique du réseau trophique pélagique exposé au stress RUV-B (Mostajir et al. 1999a). Les travaux de Sommaruga et al. (1999) sur l'impact du RUV-B sur un réseau trophique microbien (virus,

bactéries hétérotrophes, nanoflagellés hétérotrophes et ciliés) illustrent la difficulté d'évaluer l'impact du RUV-B quand plus d'un niveau trophique est considéré et soulignent l'existence de différences de sensibilité entre les composantes de ce réseau. Ces différences de sensibilité des espèces sont fonction de l'adéquation des mécanismes de protection qui préviennent les dommages induits par le RUV-B et l'efficacité des mécanismes de réparation pour corriger ces dommages. L'équilibre entre formation de dommages et réparation est critique dans la détermination de la survie d'un organisme sous stress UV-B. Les effets du RUV-B sur un certain niveau trophique peuvent être directs ou indirects (Wickham & Carstens 1998, Sommaruga et al. 1999). Ainsi, un déplacement dans l'assemblage de la communauté algale depuis les diatomées ($> 10 \mu\text{m}$) vers des petits flagellés (5-10 μm) est communément observé sous exposition au RUV-B (Mostajir et al. 1999a, Mousseau et al. 2000, Chatila et al. 2001). Bien que ce schéma soit représentatif de la tendance naturelle observée dans le milieu à l'époque de l'expérimentation, en raison de l'épuisement des éléments nutritifs, ces auteurs ont mis en évidence que les effets du RUV-B sur la structure de la communauté étaient directement induits par le rayonnement lui-même, et indirectement *via* la prédation, et non pas par une limitation en éléments nutritifs. Ainsi, lorsque les cellules étaient soumises à une forte augmentation du RUV-B, l'abondance des diatomées était la plus basse malgré la disponibilité en silice; le stress induit par le RUV-B semble avoir été assez important pour empêcher la consommation de ce nutriment.

Toutes les composantes biologiques doivent donc être étudiées simultanément, car un changement de la structure de la communauté peut avoir des implications majeures pour le

transfert de carbone, puisque la taille des producteurs primaires détermine (i) le type et la dynamique du réseau trophique et donc le nombre de niveaux trophiques et, (ii) le taux de fixation de carbone et sa séquestration potentielle (Keller et al. 1997, Legendre & Michaud 1998, Mostajir et al. 2000, Vasseur 2003).

CONTAMINANTS, COMMUNAUTÉS PLANCTONIQUES ET RAYONNEMENT ULTRAVIOLET-B

Le RUV-B constitue un facteur écologique significatif important de l'environnement aquatique, et ses effets néfastes se font ressentir aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau de l'écosystème dans sa globalité. Mais l'influence de ce rayonnement ne se limite pas seulement à une action directe sur cette vie aquatique. En effet, certains contaminants (ou tout autre composé naturel présent en dehors de la cellule-cible) peuvent également absorber ces photons énergétiques et subir alors des réactions photochimiques aux conséquences néfastes avec leur conversion photochimique en formes plus toxiques qui conduit ultérieurement à des dommages cellulaires (Larson & Berenbaum 1988). Un grand nombre de processus photochimiques différents peuvent expliquer la transformation des contaminants dans les environnements aquatiques. Un de ces processus, la photodissociation, implique l'absorption directe de la lumière par un contaminant. D'autres processus photochimiques peuvent être initiés *via* l'absorption de la lumière par des substances naturelles; on parle alors de photosensibilisation (Zepp & Cline 1977). Les vitesses auxquelles ces processus photochimiques ont lieu dans l'eau sont affectées par le

spectre du rayonnement solaire à la surface de l'eau, le transfert radiatif depuis l'air vers l'eau et la transmission de la lumière solaire dans l'eau. Or, le RUV-B est responsable de la photolyse directe de plusieurs contaminants (Zepp & Cline 1977). Parmi ces derniers, les hydrocarbures pétroliers, et plus spécifiquement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), sont considérés comme un problème environnemental majeur en raison des propriétés toxiques, mutagènes et/ou cancérigènes, de certains de ces composés (Harvey 1991). De même, les butylétains sont présents à des concentrations toxiques écologiquement significative dans les environnements côtiers (Maguire 1991, Fent 1996). Considérant leur utilisation mondiale et leur forte toxicité, les apports directs et leur persistance, ces composés représentent, et tout particulièrement le tributylétain (TBT), une contamination préoccupante des biotopes aquatiques.

Hydrocarbures aromatiques polycycliques

La plus grande partie des hydrocarbures pétroliers pénètre dans l'environnement marin de manière relativement discrète (sources naturelles sous-marines, effluents des raffineries côtières, égouts des villes, rejets industriels). Une partie minime mais bien plus visible provient d'événements catastrophiques (naufages de pétroliers, fuites lors de forages off-shore). La composition du pétrole est complexe, dont les hydrocarbures, constituants principaux, représentent plus de 75% (Posthuma 1977). Les autres composés minoritaires sont représentés par des composés aromatiques lourds (asphaltènes), des composés

hétérocycliques contenant de l'oxygène, de l'azote ou du soufre et parfois des sels minéraux divers.

Les hydrocarbures peuvent être regroupés en quatre grandes classes majeures (Albers 1995).

- ✓ *Les alcanes linéaires (ou n-alcanes, paraffines)* : ce sont des composés de formule générale C_nH_{2n+2} . Le nombre de carbone peut varier de 5 (*n*-pentane) jusqu'à 60 (*n*-hexacontane). Les *n*-alcanes représentent généralement entre 10 et 40% d'un pétrole brut.
- ✓ *Les alcanes ramifiés (ou iso-alcanes, iso-paraffines)* : ces molécules se retrouvent dans les pétroles bruts dans des proportions sensiblement égales à celles des *n*-alcanes.
- ✓ *Les cyclo-alcanes (naphènes)* : Ils forment une famille complexe de composés saturés cycliques le plus souvent substitués. Cette famille d'hydrocarbures peut représenter entre 30 et 50% d'un pétrole brut.
- ✓ *Les aromatiques* : Ils constituent un mélange de nombreux composés tels que les benzènes mono- et polyalkylés et les polyaromatiques (2 à 6 noyaux) diversement substitués. En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les *n*-alcanes et ne représentent que 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut. On inclut aussi dans ce groupe des molécules hétérocycliques généralement peu abondantes dans le pétrole.

Lorsque les produits pétroliers sont libérés dans l'environnement aquatique, des changements immédiats de leurs propriétés physiques et chimiques ont lieu en raison de plusieurs processus simultanés de dispersion et dégradation (Fig. 6A). Ces processus dépendent des caractéristiques physico-chimiques du pétrole (densité, viscosité, etc.) et des caractéristiques hydrodynamiques de la mer au moment et à l'endroit du déversement. Ce sont l'évaporation, la dissolution, la dispersion dans la colonne d'eau, l'oxydation microbienne et photochimique, l'émulsification eau-dans-pétrole (formation de mousse), l'adsorption sur le matériel particulaire en suspension, l'agglomération et la sédimentation (Payne & Phillips 1985).

Le pétrole ainsi dispersé dans les écosystèmes aquatiques peut donc se présenter en partie sous une forme dissoute, dont la composition reflète les différentes solubilités des composés individuels dans l'eau de mer. Cette phase dissoute sera différente et enrichie en hydrocarbures aromatiques légers par rapport au pétrole originel (Anderson et al. 1974). Or, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) contribuent en grande partie à la toxicité des hydrocarbures pétroliers et constituent une proportion importante des extraits aqueux de ces pétroles. Bien qu'ils soient considérés comme un groupe de composés hydrophobes, les HAPs possèdent en effet une large gamme de solubilité, cette dernière diminuant au fur et à mesure que le nombre de noyaux aromatiques augmente. Ainsi, le naphthalène possède une solubilité d'environ 30 mg L^{-1} alors que les HAPs possédant cinq noyaux ont une solubilité située entre $0,5$ et 5 ng L^{-1} (Neff 1979).

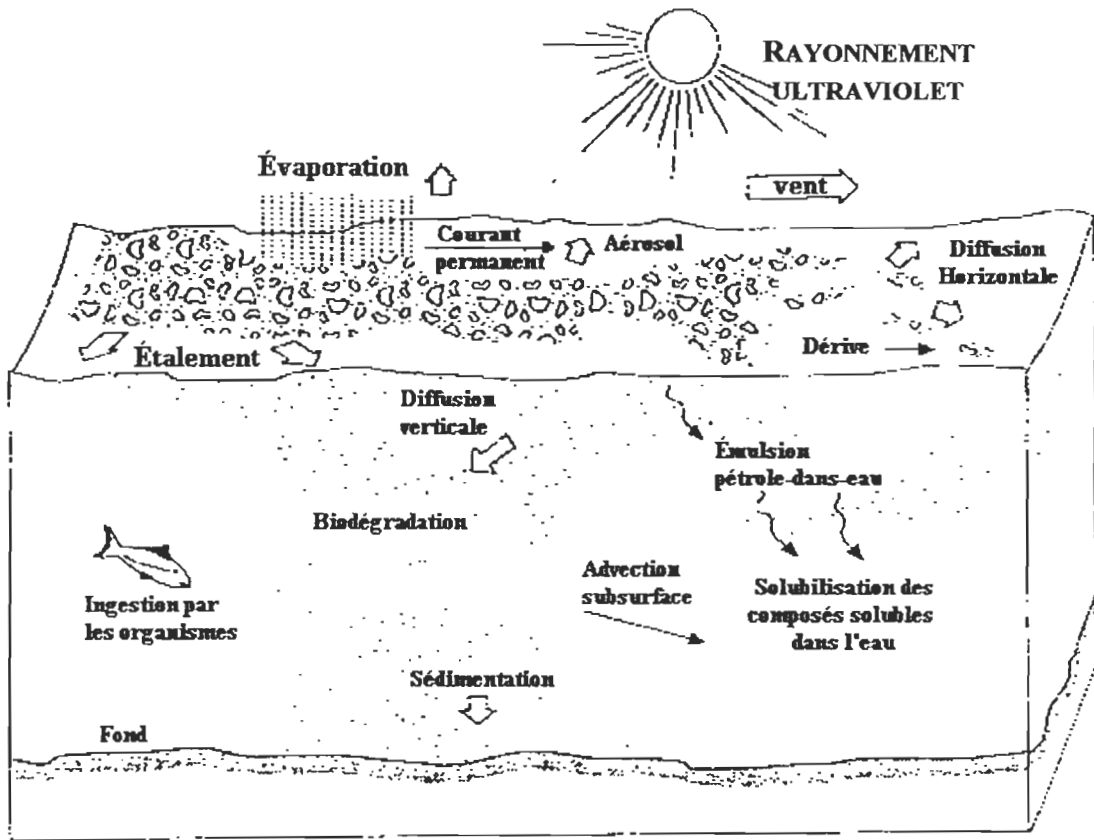
Biodégradation et toxicité

La biodégradation est un facteur essentiel dans l'élimination du pétrole. Les microorganismes capables d'attaquer ces molécules (microorganismes hydrocarbonoclastes) sont ubiquistes et d'une grande diversité. Parmi ces organismes aptes à se développer sur les hydrocarbures, les bactéries sont qualitativement et quantitativement prépondérantes (Bertrand & Mille 1989). Le rejet en mer du pétrole correspond à un apport de carbone et d'énergie utilisable par ces microorganismes pour leur croissance, mais ce pétrole ne sera métabolisé qu'en présence de concentrations bien définies d'éléments nutritifs. Dans les eaux de surface de l'océan pélagique, où ces éléments peuvent se retrouver à des concentrations très faibles, la vitesse de décomposition du pétrole peut être limitée (Atlas & Bartha 1993).

Bien que la toxicité potentielle de la fraction des hydrocarbures solubles dans l'eau ait été démontrée (Hodson et al. 1977, Griffiths et al. 1981), de tels effets d'inhibition vis-à-vis des communautés bactériennes semblent être relativement rares (Delille et al. 1998). En effet, les HAPs, tels que le naphthalène et le phénanthrène, sont aisément sujets à une dégradation aérobie microbienne. Cette dégradation est généralement initiée par la dihydroxylation de l'un des noyaux aromatiques, suivie du clivage de noyau dihydroxylé. Le squelette carboné résultant de ce clivage est ensuite démantelé et donne lieu au clivage du second noyau aromatique. Cette dégradation microbienne fait ainsi appel aux voies métaboliques et donnent lieu à des intermédiaires dihydroxylés (Harayama et al. 1999).

Figure 6. Processus impliqués dans le devenir (A) des hydrocarbures et, (B) du tributylétain (TBT) dans l'environnement aquatique.

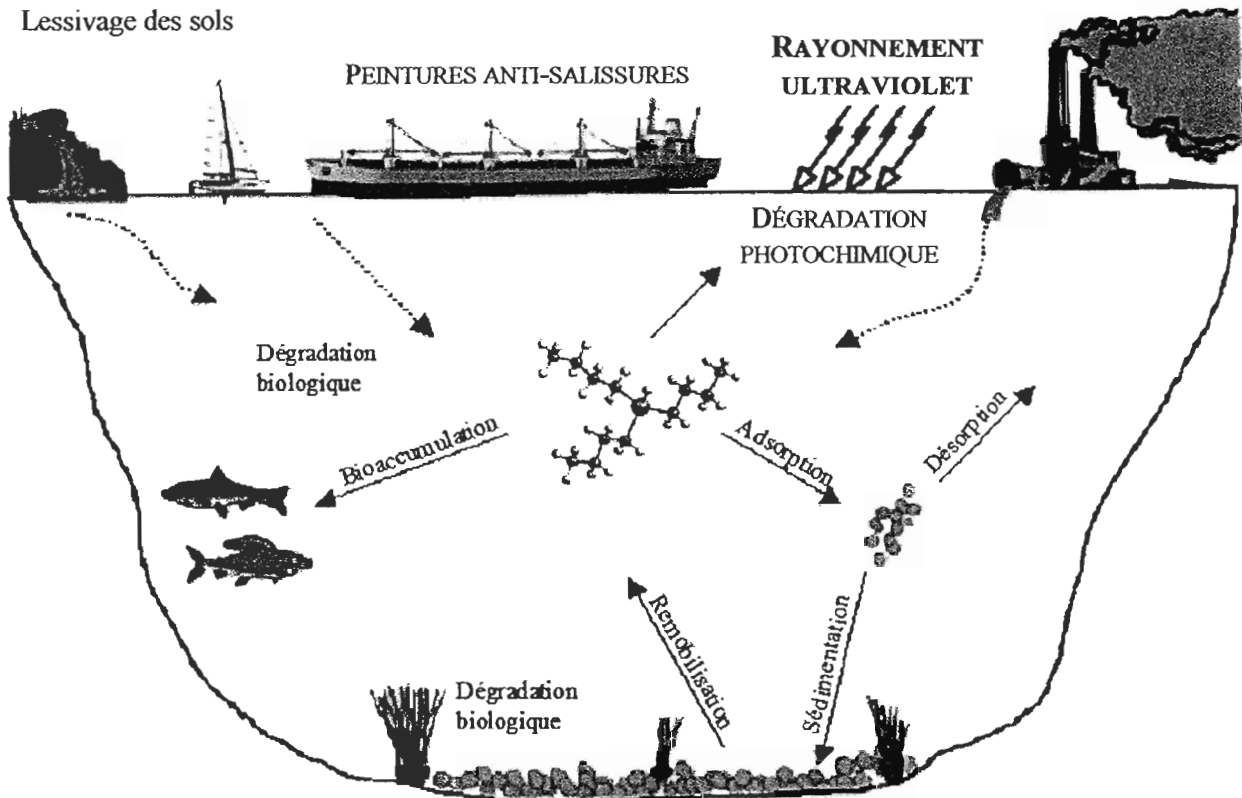
A



B

Eaux municipales
Stations d'épuration
Bassin versant
Lessivage des sols

Eaux industrielles



Ainsi, les hydrocarbures aromatiques simples tels que le naphthalène et le phénanthrène sont rapidement dégradés. Les HAPs possédant quatre noyaux aromatiques et plus tendent à s'adsorber sur la matière en suspension, en raison de leur moins grande solubilité (Neff 1979). Ceci constitue une contrainte majeure pour la biodégradation, mais certaines bactéries capables de les minéraliser ont été mises en évidence (dégradation en CO₂ et H₂O) (Harayama 1997).

Il est également démontré que les HAPs engendrent des effets toxiques sur les communautés phytoplanctoniques, et que ces effets sont surtout dus aux composés solubles dans l'eau, généralement désignés sous le terme WSF (Water Soluble Fraction) (Winters et al. 1977). Le retard de la croissance algale et l'inhibition de la photosynthèse par ces composés ont été démontrés, à la fois suite au mélange direct dans le milieu et avec les extraits aqueux (Vandermeulen & Ahern 1976, Bate & Crafford 1985, Roy et al. 1991, Siron et al. 1991, Siron et al. 1996). L'appareil photosynthétique constitue une cible majeure pour la toxicité aiguë des HAPs. En effet, ces derniers peuvent interférer avec les structures membranaires hydrophobes des thylakoïdes et conduire ainsi à une distorsion membranaire altérant la capacité photosynthétique des organismes (Newsted & Giesy 1987, Krylov et al. 1997).

En raison des différences de sensibilité, les espèces phytoplanctoniques montrent une grande variabilité dans leur réponse face à la présence d'hydrocarbures pétroliers. Ainsi, Harrison et al. (1986) ont observé une stimulation de la croissance pour des faibles

concentrations en hydrocarbures (i.e. 1 mg L^{-1}) et une totale inhibition pour des concentrations plus élevées (i.e. 100 mg L^{-1}). Ces différences varient en fonction des espèces considérées, de la température et de la lumière. Les diatomées y seraient particulièrement sensibles en raison de la présence d'une frustule de silice qui absorbe et retient ces composés au sein de ces cellules (Bate & Crafford 1985), et certainement en fonction de la composition du pétrole dissous.

Le mécanisme d'inhibition de la fixation photosynthétique de carbone par les hydrocarbures semble être bimodal, avec une inhibition différentielle à des concentrations faibles et élevées (Vandermeulen & Ahern 1976). Des études en laboratoire ont révélé que les effets du pétrole sur les assemblages planctoniques naturels ne sont pas seulement fonction de l'espèce considérée, mais également de l'état physiologique et nutritionnel de cette espèce, de la température de l'eau, du type de pétrole et des conditions lumineuses (Harrison et al. 1986).

Au niveau des communautés bactériennes hétérotrophes, les dispersions pétrolières ont un effet global de stimulation (Parsons et al. 1984, Delille & Siron 1993, Siron et al. 1996). Cette stimulation peut être partiellement induite par les apports de matière organique rendus disponibles à partir du phytoplancton, bien que la réponse relative à court terme de la microflore dégradant le pétrole suggère un effet direct du pétrole et révèle la capacité

potentielle des communautés bactériennes indigènes à s'adapter à un événement de dispersion pétrolière (Prince 1993).

Photodégradation et phototoxicité

En raison de leur structure chimique, et plus particulièrement de leur système d'électrons- π , les HAPs absorbent facilement la lumière solaire dans les régions du visible et de l'ultraviolet (RUV-A et RUV-B) et sont donc particulièrement sensibles aux effets photochimiques du RUV (Arfsten et al. 1996). Cette absorption de photons très énergétiques conduit à une photodégradation (photooxydation et photo-dissociation) des composés originels présents dans le milieu. Ainsi, Karydis (1982) a observé un déplacement du spectre de fluorescence d'un pétrole brut irradié vers des longueurs d'onde plus courtes. La fraction aromatique de pétrole est, par conséquent, enrichie en molécules plus petites, et plus hydrosolubles en raison de leur forte polarité.

La toxicité des HAPs envers les organismes aquatiques a ainsi été associée avec la conversion photochimique de ces composés en photoproduits plus toxiques par de nombreux auteurs (Karydis 1982, Huang et al. 1993b, Ren et al. 1994, Ali et al. 1995, Arfsten et al. 1996, Huang et al. 1997a,b, Mallakin et al. 1999, Marwood et al. 1999, Nikkilä et al. 1999). Les travaux de Ali et al. (1995) sur la dissolution et la photodégradation du phénanthrène mettent en évidence la formation rapide de nombreux

photoproduits. Il est intéressant de noter ici comment un seul hydrocarbure peut générer plusieurs produits différents lorsqu'il est photodégradé.

Les HAPs sont des molécules photoréactives (Dabestani & Ivanov 1999) et il y a phototoxicité induite lorsque le RUV est absorbé par les liaisons conjuguées des molécules d'HAPs, les excitant à un état triplet (Pelletier et al. 1997); on peut parler de toxicité photoactivée ou de toxicité photosensibilisée. Dans le cas d'une photoactivation, le composé est modifié suite à l'énergie absorbée, ce qui peut conduire à un photoproduit plus toxique que le composé originel (Little et al. 2000). Par contre, lorsqu'il y a photosensibilisation, le composé transfère l'énergie absorbée à des composés endogènes, formant alors des espèces réactives, tels que des radicaux libres qui causent des dommages cellulaires (Little et al. 2000).

Cette absorption de photons très énergétiques conduisant à une photomodification des HAPs (photooxydation et photo-dissociation) en espèces nouvelles est un processus rapide sous des niveaux environnementaux significatifs de lumière actinique (Huang et al. 1993b). Dans plusieurs cas, les HAPs ainsi modifiés étaient plus toxiques que les HAPs originels, vraisemblablement dû à la combinaison d'une solubilité, d'une biodisponibilité et d'une réactivité accrues (Karydis 1982, Huang et al. 1993b, Huang et al. 1997a,b, Mallakin et al. 1999).

Huang et al. (1993b) ont étudié la photoinduction de la toxicité de trois HAPs sur une plante aquatique supérieure, *Lemna gibba*, et cela sous différentes conditions de lumière. Ils ont ainsi observé une $\frac{1}{2}$ vie très courte pour les trois composés testés, si l'on considère une échelle temporelle environnementale (3 à 33h en fonction du HAP considéré avec RUV-B = $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mettant en évidence une photomodification rapide. De plus, une intensité de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de lumière solaire simulée active fortement la phytotoxicité, alors que $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de lumière visible (sans RUV) n'induit pas une inhibition de la croissance par les composés considérés dans cette étude. Lorsque les niveaux de rayonnement visible et de RUV-A étaient maintenus constants, mais que le RUV-B était augmenté, ils ont observé que la toxicité des trois HAPs était proportionnelle à l'intensité de ce type de rayonnement.

Marwood et al. (1999) ont souligné l'inhibition du transport photosynthétique d'électrons en aval du PS II par un photoproduit de l'anthracène : le 1,2-dihydroxyanthraquinone (1,2- dhATQ). Il semblerait que le HAP et le HAP oxydé ont des modes d'action différents au sein de l'appareil photosynthétique (Marwood et al. 1999). L'anthracène est un photosensibilisateur efficace, qui est également rapidement photooxydé en une variété de produits toxiques (Huang et al. 1997a, Mallakin et al. 1999).

De plus, la photolyse des HAPs a lieu efficacement dans les systèmes biologiques avec formation d'oxygène singulet. L'oxygène singulet est un oxydant hautement sélectif

réagissant rapidement avec seulement des composés riches en électrons tels que les HAPs. L'incorporation d'oxygène au cours de la photodégradation peut augmenter la solubilité des hydrocarbures, et donc les rendre davantage biodisponibles (Ali et al. 1995). La phototoxicité des HAPs est principalement causée par des mécanismes photodynamiques qui nécessitent de l'oxygène. Les radicaux oxygénés, i.e. hydroxyle (OH*), superoxyde, ou oxygène singulet, peuvent endommager les membranes cellulaires *via* une peroxydation lipidique (Girotti 1990). Le RUV augmente également la liaison covalente des HAPs sur l'ADN (Arfsten et al. 1996). Des études au niveau cellulaire indiquent que la co-exposition HAPs + RUV cause et/ou augmente la formation de radicaux capables d'endommager les composantes cellulaires essentielles telles que la membrane cytoplasmique et l'ADN (Arfsten et al. 1996).

Non seulement le RUV-B peut augmenter la toxicité des HAPs, *via* une photomodification de ces molécules mais il peut également induire des synergies antagonistes pour les organismes aquatiques. En effet, Babu et al. (2001) ont observé que le photoproduit de l'anthracène, le 1,2-dihydroxyanthraquinone (1.2-dhATQ) inhibait le transport photosynthétique d'électrons alors que le cuivre (Cu^{2+}) seul n'inhibait pas la photosynthèse. Par contre, lorsque ces deux composés étaient mis en présence, une augmentation de l'altération de la fluorescence de la chlorophylle se produisait. Ces auteurs ont ainsi mis en évidence que la toxicité du cuivre, à faible concentration pouvait être

induite par la présence d'hydrocarbures photooxydés, *via* la formation d'espèces réactives d'oxygène.

Des travaux antérieurs ont démontré que cette toxicité photoinduite des HAPs est liée à leur structure moléculaire et plus spécifiquement à la différence d'énergie entre l'orbitale occupée la plus externe (HOMO) et l'orbitale inoccupée la plus basse (LUMO) (Mekenyan et al. 1994; Veith et al. 1995). Selon les modèles, les composés ayant un espace HOMO-LUMO compris entre 6,5 et 8,1 eV sont potentiellement phototoxiques. Certains HAPs, tels que le naphthalène (10.06 eV), le diméthyl-naphthalène (8.30 eV) et le triméthyl-naphthalène (8.29 eV) ne représenteraient donc pas de risques de phototoxicité de part la valeur de leur espace HOMO-LUMO. Cependant, Ren et al. (1994) ont démontré certains effets du naphthalène qui étaient photoinduits, ce composé ayant une absorbance appréciable dans le RUV-B. Par conséquent, même si certains composés ne se retrouvent pas dans la gamme optimale de différence d'énergie HOMO-LUMO, ils peuvent exhiber une phototoxicité relativement plus importante que ne le prédisent ces modèles, si ces composés sont bioaccumulés en plus grande quantité que d'autres produits plus phototoxiques. De plus, l'augmentation accrue de la dose de RUV-B tendrait à augmenter la phototoxicité de ces composés (Mekenyan et al. 1994).

Les risques réels des HAPs sur la vie aquatique peuvent donc être dus aussi bien à leur toxicité originelle qu'à une toxicité photoinduite suite à une exposition au RUV. On peut

ainsi présumer que les risques augmentent avec une augmentation de l'intensité de ce type de rayonnement dans les eaux marines de surface. Il est donc important d'évaluer la toxicité des HAPs structurellement altérés par le RUV-B puisqu'il apparaît que ces composés peuvent alors devenir plus toxiques (Huang et al. 1993b), car cette question demeure obscure étant donné que la majorité des travaux cités ont été réalisés en laboratoire et les résultats de terrain sont rarement ceux explicités (Pelletier & Delille *comm. pers.*).

Tributylétain

Au cours des 20 dernières années, le TBT a été considéré comme un contaminant majeur des eaux côtières. En effet, en raison de son caractère biocide, le tributylétain (TBT) fut grandement employé à partir des années 70s dans les peintures anti-salissures recouvrant la coque des bateaux et constituant ainsi la principale voie d'introduction directe dans l'environnement aquatique. C'est un organoétain comprenant trois chaînes butyles attachées à un atome d'étain par des liaisons covalentes étain-carbone (Sn-C). De formule chimique $(C_4H_9)_3Sn^+$, le TBT est un cation polaire hydrophobe de par sa structure trigonale pyramidale qui se caractérise par une dualité chimique lorsqu'il est dissous :

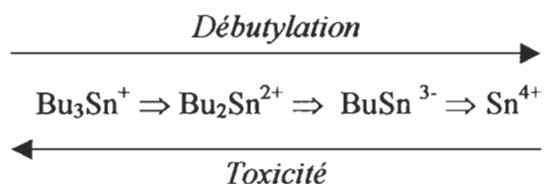
- ✓ Un caractère organique conféré par les trois groupements butyles (Laughlin et al. 1987), et lui permettant de s'associer à des phases organiques, d'où son caractère lipophile, et

- ✓ Un caractère ionique conféré par l'atome d'étain chargé + 1 (Laughlin et al. 1987), et qui lui permet de faire des liaisons ioniques avec des ions dissous tels que Cl^- , OH^- , CO_3^{2-} (Laughlin et al. 1986) ou de s'adsorber aux particules en suspension (i.e. parois externes des cellules phytoplanctoniques ou détritiques, minérales en suspension dans la colonne d'eau) (Saint-Louis 1994).

Goldberg (1986) décrit le TBT comme la substance la plus toxique jamais introduite délibérément dans les eaux naturelles en raison des effets néfastes qu'il engendre sur les formes de vie autres que celles visées par son usage. En effet, la lixiviation du TBT à partir des surfaces peintes a conduit à une contamination de la colonne d'eau et du compartiment sédimentaire dans de nombreuses zones côtières (Maguire 2000). Ainsi, des concentrations élevées sont encore mesurées avec des valeurs supérieures à 100 ng L^{-1} (Alzieu 1998). Or des concentrations de l'ordre de 1 ng L^{-1} sont suffisantes pour induire l'apparition de caractéristiques mâles chez les femelles de certaines espèces de gastéropodes, à savoir le phénomène bien trop connu d'imposex, à l'origine de la prise de conscience du problème environnemental posé par ce composé. Ces concentrations en TBT atteints dans l'environnement aquatique sont fonction des apports, de la dégradation et des temps de rétention au sein du système, c'est à dire le résultat de l'intégration d'un nombre important de variables dynamiques (Stebbing 1985).

Plusieurs mécanismes biotiques et abiotiques vont ainsi intervenir dans le devenir du TBT dans l'environnement aquatique (Fig. 6B). Les mécanismes abiotiques comprennent la volatilisation, l'adsorption, la dégradation chimique, la photolyse et la dilution due aux mouvements de l'eau (Maguire 1987), ainsi que le transport du TBT depuis la colonne d'eau vers la micro-couche de surface. L'adsorption sur la matière particulaire en suspension, suivie de la sédimentation, est un mécanisme rapide et très important du retrait du TBT de la colonne d'eau. Le devenir biotique comprend, quant à lui, la biosorption, la prise en charge et la dégradation biologique.

Concernant la dégradation du TBT dans l'environnement, et quel que soit le processus en jeu, elle se définit comme la perte des groupements organiques, c'est à dire une débutylation progressive du TBT (Bu_3Sn^+) avec la formation de dibutylétain (DBT : $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$), de monobutylétain (MBT : BuSn^{3+}) et de l'étain inorganique (Sn^{4+}) et ceci s'accompagne d'une perte croissante du potentiel de toxicité (Champ & Pugh 1987):



Cette débutylation peut se faire selon différents processus (Blunden & Chapman 1982) :

- ✓ Le clivage biologique
- ✓ Le rayonnement UV
- ✓ Le clivage chimique
- ✓ Le clivage thermique
- ✓ Le rayonnement gamma (γ)

Parmi ces processus, le clivage thermique est le moins probable dans l'environnement car la liaison Sn-C est stable jusqu'à plus de 200°C. De même, le rayonnement γ est peu probable car son intensité est négligeable à la surface terrestre. D'un point de vue environnemental, seuls les deux premiers processus peuvent être significatifs et influencer sur le devenir et les effets toxiques de ces composés organométalliques en altérant leur volatilité, adsorptivité et solubilité dans le milieu (Hoch 2000).

Biodégradation et toxicité

De nombreux travaux ont mis en évidence la capacité de certains organismes à métaboliser le TBT, incluant la participation active d'espèces phytoplanctoniques et bactériennes dans les écosystèmes aquatiques (Maguire et al. 1983, 1984, Seligman et al. 1986, Lee et al. 1989, Reader & Pelletier 1992, Saint-Louis et al. 1994, Tsang et al. 1999).

Ainsi, Seligman et al. (1986) ont étudié la dégradation du TBT par une communauté phytoplanctonique naturelle. Les demie-vies mesurées après incubation à une température ambiante et sous exposition à la lumière du jour sont de l'ordre de 5 à 12 jours (concentration initiale en TBT de $2 \mu\text{g l}^{-1}$). Le DBT et le MBT ont été identifiés comme produits de dégradation. Lorsque les essais ont été effectués à l'abri de la lumière, les demie-vies étaient du même ordre de grandeur quoique légèrement plus élevées (9 à 15 jours). Ceci laisse donc supposer une activité métabolique liée aux microorganismes photosynthétiques. De même, ces auteurs ont trouvé que la dégradation du TBT dans les eaux d'un port de plaisance (demie-vie = 6 jours à la lumière et 7 jours à l'obscurité) était essentiellement imputable à des processus biologiques : en présence de formol la demie-vie mesurée était de 94 jours.

Cette capacité de dégradation du TBT par un organisme serait liée à sa capacité à le bioaccumuler et à le métaboliser en espèces moins toxiques (DBT et MBT). Ainsi, l'assimilation du TBT peut se faire selon deux mécanismes principaux : la biosorption et l'absorption (McDonald & Trevors 1988, Tobin & Cooney 1999). La biosorption se réfère à l'adsorption physico-chimique rapide et aux processus d'échange d'ions qui se produisent au niveau de la surface cellulaire. C'est un processus indépendant du métabolisme. Saint-Louis et al. (1997) ont ainsi observé une adsorption ionique passive en surface suivie par une absorption intracellulaire facilitée du TBT chez *Pavlova lutheri*. En effet, la nature anionique de la paroi cellulaire représente des sites de liaison favorables à l'adsorption des cations TBT (Bu_3Sn^+). Tsang et al. (1999) ont ainsi démontré que la biosorption du TBT

sur les parois cellulaires algales conduisaient à une réduction de 40% de la concentration initiale du TBT dans le milieu. De même, Tam et al. (2002) reportent des pertes de plus de 90% et 85% du TBT dans le milieu en raison des processus de sorption par *Scenedesmus dimorphus* et *Chlorella miniata*, respectivement.

Le deuxième mécanisme est un processus plus lent d'assimilation active, dépendante du métabolisme. Ce lent processus résulte en l'absorption et l'accumulation intracellulaire du TBT, et plus particulièrement dans les tissus et organelles riches en lipides. Par la suite, le transport du TBT dans l'espace intracellulaire peut être facilité par certains canaux ioniques ou par des transporteurs dans la membrane cellulaire (Tam et al. 2002). De plus, le gradient de concentration différentiel qui s'établit alors entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule due à la biosorption du TBT en surface facilite une augmentation de la concentration interne en TBT, que cela soit dû à un transport facilité ou à une diffusion passive (Tsang et al. 1999). La débutylation du TBT impliquerait ensuite une cascade de réactions enzymatiques initiées par les concentrations intracellulaires croissantes en TBT. Le système enzymatique dioxygénase impliqué dans l'hydroxylation des HAPs par les algues pourrait également être impliqué dans l'hydroxylation de ce composé (Lee et al. 1989).

Les bactéries peuvent également jouer un rôle important dans le devenir du TBT dans l'environnement aquatique. En effet, des auteurs ont reporté l'existence de bactéries tolérantes au TBT, ayant la capacité (i) de le dégrader en composés moins toxiques, (ii) de l'excréter à l'aide de protéines membranaires, et (iii) de l'utiliser d'un point de vue

métabolique comme source de carbone (Harino et al. 1997, Kawai et al. 1998, Pain & Cooney 1998, Dubey & Roy 2003, Kubota et al. 2004).

Mais cette capacité à dégrader le TBT, une fois que celui-ci se retrouve en concentration élevée au niveau des cellules, est fortement dépendante des espèces considérées. Ainsi, l'incapacité de certaines espèces à le biodégrader conduit à une accumulation intracellulaire de TBT très toxique. De plus, cette restriction de l'activité biologique dépend également d'autres conditions environnementales limitantes concernant la vie de ces organismes, telles que la température, la disponibilité en éléments nutritifs et la lumière (Maguire et al. 1984, Hoch 2001). La toxicité du TBT va ainsi varier selon les organismes planctoniques, la spéciation du TBT, le stade de développement et la capacité de métabolisation de ces organismes, ainsi que leur histoire environnementale. Elle va affecter tous les niveaux de l'organisation biologique (molécule, cellule, organe, etc.) (Fent 1996).

Le retard de la croissance algale, l'inhibition de la photosynthèse et l'augmentation du taux de respiration accompagnant la suppression de ce mécanisme, de même que la diminution de la teneur en chlorophylle α , suite à une exposition au TBT, ont été démontrés (Beaumont & Newman 1986, Fargašová, 1997, Fargašová, 1996, Huang et al. 1993, Huang et al. 1996, Sidharthan et al. 2002). De plus, le TBT semble affecter les processus d'absorption, d'accumulation et de métabolisme des éléments nutritifs, et plus particulièrement celui de l'azote et du phosphore (Mouhri et al. 1998, Sidharthan et al.

2002). L'effet du TBT se produirait d'abord par un fort blocage du processus d'assimilation des phosphates. Cette immobilisation suppose alors un ralentissement des mécanismes de photophosphorylation et d'utilisation du phosphate inorganique ($ADP + P \rightarrow ATP$). Par la suite, le manque d'ATP conduirait à une inhibition des processus d'assimilation et d'incorporation de l'azote (Mouhri et al. 1995). Toutefois, il est à noter que ces différents effets du TBT sur le métabolisme nutritif ont été observés à des concentrations en TBT de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Huang et al. (1996) ont également observé que le TBT pouvait inhiber la photophosphorylation et ceci à des concentrations d'intérêt environnemental (de 3,6 à 244 ng L^{-1}). Ils ont également démontré qu'un tel impact au sein de l'appareil photosynthétique conduisait à une plasmolyse des cellules, avec déformation des submicrostructures, des membranes nucléaires et destruction des structures internes.

Photodégradation

On connaît encore peu sur l'importance de la photolyse sur le devenir des composés organoétains, et plus particulièrement du TBT, dans l'environnement aquatique. Cependant, la photolyse par la lumière naturelle semble être la voie la plus rapide de dégradation dans l'eau (Hoch 2001). En effet, les énergies de dissociation pour les liaisons Sn-C sont de l'ordre de 190-220 kJ mol^{-1} (Blunden & Chapman 1982). Le rayonnement UV de longueur d'onde de 290 nm correspond à une énergie d'environ 300 kJ mol^{-1} . Par conséquent, le clivage de la liaison Sn-C peut théoriquement être initié par la gamme de longueurs d'onde

UV-B. Bien que les butylétains transmettent l'essentiel du spectre solaire, ils absorbent une faible partie de la composante UV-B qui peut donc causer la photodégradation directe de ces composés dans les eaux de surface.

La dégradation photolytique des organoétains en solution dans des solvants, ou même adsorbés sur les sols a été démontrée par de nombreux travaux expérimentaux rapportés par Blunden & Chapman (1982). Comparativement, la sensibilité au rayonnement UV des organoétains en solution aqueuse a été très peu étudiée. Maguire et al. (1983) ont trouvé que la demie-vie du TBT en solution aqueuse et à la lumière du jour était supérieure à 89 jours. Mais sous irradiation UV à 300 nm, ces mêmes auteurs ont observé que la photodégradation est plus rapide (demie-vie = 1,1 j) qu'à 350 nm (demie-vie > 18 j). De plus, la présence d'acide fulvique favoriserait la dégradation (demie-vie à 300 nm = 0,6 j). L'analyse des produits de dégradation ainsi formés a montré que la débutylation du DBT en MBT était plus lente que celle du TBT en DBT. Toutefois, il est à noter que ces expériences ont été réalisées en l'absence totale de microorganismes et donc écologiquement peu significatives.

De plus, les concentrations en TBT dans la micro-couche de surface s'expliquent par son caractère hydrophobe et par la nature organique de l'interface eau-air qui favorise son accumulation (Adelman et al. 1990). Cette micro-couche peut donc jouer un rôle important dans le transport et les processus de transformation des composés butylétains (Saint-Louis

2003). Ainsi, à cette interface eau-air, le processus de photodégradation peut prendre toute son importance.

Dans les zones maritimes à fortes concentrations en TBT, la diminution du taux de croissance sur un certain nombre d'espèces d'algues communes peut avoir un effet significatif sur la productivité primaire globale de ces régions (Beaumont & Newman 1986.). En outre, la croissance d'espèces tolérantes au TBT peut conduire à l'altération de la succession annuelle des blooms planctoniques et donc avoir un effet profond sur la vie marine à chaque niveau de la chaîne alimentaire (Beaumont & Newman 1986). En effet, Petersen & Gustavson (1998, 2000) ont démontré une adaptation et une augmentation de la tolérance de certaines espèces au TBT, en fonction de leur taille mais également de leur stade de développement, conduisant ainsi à des changements structuraux de l'écosystème.

APPROCHE EN MÉSOCOSME

L'étude de processus aussi bien écologiques qu'écotoxicologiques comporte quelques difficultés. En effet, les données de terrain peuvent être difficiles à interpréter en particulier en raison de la grande complexité des interactions qui s'y produisent. Ainsi, il est peu probable de pouvoir suivre les caractéristiques physico-chimiques et biologiques d'une même masse d'eau dans un environnement côtier donné, que ce soit dans le temps ou dans l'espace, et y déterminer aussi les effets toxiques de substances xénobiotiques.

Par contre, les expérimentations en laboratoire, souvent trop réductionnistes, sont fréquemment réalisées sous des conditions éloignées de la réalité, particulièrement en ce qui concerne la distribution spectrale de la lumière et les volumes d'eau utilisés. Quoique utiles, car elles constituent une première étape dans l'étude des mécanismes de processus individuels et des effets sur des organismes particuliers, les données de laboratoire sont le plus souvent difficiles à extrapoler à l'environnement naturel puisque basées sur des espèces individuelles. Or, la plus petite unité fonctionnelle dans un milieu naturel n'est pas l'individu isolé, mais la population de chaque espèce (ou communauté d'espèces) qui la compose (Ramade 1992). L'action d'un contaminant sur les populations sera conditionnée par son interaction avec les facteurs abiotiques et biotiques, de sorte que le cadre de référence pour évaluer les effets d'un contaminant sur les populations qui lui sont exposées sera l'écosystème tout entier (Ramade 1992).

Le développement des écosystèmes expérimentaux (i.e microcosme, mésocosme) a permis de combler en partie la lacune existante entre ces deux échelles d'investigation que sont le laboratoire et le terrain. En effet, les mésocosmes sont des outils de recherche qui peuvent être contrôlés, manipulés et répliqués afin de simuler les milieux naturels. Ils agissent comme des modèles biologiques, rendant possible l'observation directe et la quantification des effets d'un ou plusieurs stress dans des environnements répliqués, aussi proches que possible de la nature, en demeurant sous contrôle expérimental. De tels écosystèmes expérimentaux peuvent se définir comme un assemblage naturel d'organismes représentant plusieurs niveaux trophiques, permettant de mesurer les effets indirects d'un

stress causés par les interactions spécifiques telles que les relations proies-prédateurs et de compétition (Gearing 1988). Les communautés propres à un écosystème donné jouent un rôle majeur dans les processus écologiques fondamentaux et modifient de ce fait leur environnement physico-chimique. Inversement ces processus influencent la composition et la diversité des communautés (Ramade 1992). Les propriétés d'un écosystème ne peuvent en aucun cas être considérées comme identifiables à la somme des propriétés de chacun de ses composantes élémentaires prises isolément (Frontier & Pichod-Viale 1995).

Les mésocosmes constituent donc un outil de premier choix pour la détermination et l'évaluation des stress environnementaux sur les communautés aquatiques, du fait des différents niveaux d'organisation biologique et des degrés élevés de réalisme environnemental qu'ils peuvent représenter (Cairns 1988).

Les approches en mésocosmes permettent ainsi d'étudier, entre autres, les interactions entre niveaux trophiques, les transferts d'énergie, les cycles biogéochimiques des éléments fondamentaux et des composés chimiques. Ces interactions et autres processus sont difficiles à élucider dans le milieu naturel en raison des processus d'advection et/ou l'incapacité à suivre une même communauté dans le temps (Lalli 1990). Mais, il est nécessaire de prendre conscience que cette approche demeure réductionniste. En effet, il est impossible de maîtriser et transposer toutes les variables environnementales contrôlant la structure et le fonctionnement d'un écosystème. Ainsi, plusieurs populations de producteurs primaires, de consommateurs et de carnivores ne peuvent pas être maintenues, en équilibre,

sur une période de temps indéfinie, de même que plusieurs processus naturels importants sont éliminés. Dans les expériences sur les contaminants dans de tels écosystèmes contrôlés, la surexposition des organismes à un composé donné peut conduire à une situation où les concentrations ne sont pas diluées par les processus de mélange vertical ou d'advection. L'effet observé sera donc maximal et non typique de l'environnement naturel. Pour ces raisons, il n'est pas raisonnable d'attendre des mésocosmes qu'ils soient la réplique exacte de l'environnement aquatique considéré. C'est à l'expérimentateur de considérer les variables utiles et fondamentales nécessaires à maintenir au sein du mésocosme et ceci en fonction des objectifs de recherche spécifiques à atteindre. Ainsi, les dimensions optimales de mésocosmes pour le développement de communautés planctoniques dépendent de ces objectifs, mais également du nombre de niveaux trophiques isolés, de la densité et de la diversité spécifique (Kuiper et al. 1983). De ces dimensions découlera le maintien de l'équilibre de l'écosystème, l'effet du confinement, c'est à dire la manière dont l'écosystème isolé va dériver dans le mésocosme par rapport au milieu naturel dont sont issus les assemblages planctoniques et par là déterminera aussi la durée de l'expérimentation. Cette durée est directement liée au temps de génération des organismes en présence (Kuiper 1982).

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

La plupart des travaux antérieurs sur les effets du RUV-B ont porté sur des compartiments biologiques spécifiques, avec peu d'intérêt pour les interactions entre les différents maillons trophiques. Cependant, ces interactions peuvent largement affecter l'image finale du réseau trophique microbien exposé à un stress associé au RUV-B. C'est pourquoi l'approche expérimentale adoptée dans la présente étude consiste en l'utilisation de microcosmes (i.e. mésocosmes de taille plus petite). En effet, ils représentent des substituts d'écosystèmes où plusieurs aspects des réponses aux perturbations induites par l'expérimentateur peuvent être suivis simultanément. Ainsi, il est possible de moduler les paramètres visés par l'étude, à savoir une augmentation ou non du RUV-B, la présence ou non de contaminants, et de déterminer l'importance qualitative et quantitative de ces paramètres sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème considéré. La concentration initiale en contaminants est également contrôlée.

En utilisant cette approche de type pseudo-écosystémique, Mostajir et al. (1999a, b) ont mis en évidence que l'augmentation du RUV-B favorisait les cellules de petite taille dans l'assemblage planctonique. La diminution des effectifs des cellules de grande taille peut donc induire une modification de la structure et de la dynamique de la chaîne alimentaire pélagique et modifier sensiblement le rôle de la pompe biologique à CO₂ de l'écosystème marin (Mostajir et al. 2000). De plus, les effets du RUV-B sur l'appareil photosynthétique,

ainsi que sur la synthèse des protéines peuvent fragiliser la capacité des cellules à faire face à un stress additionnel (i.e. pollution anthropique).

De même, l'évaluation des effets des contaminants, tels que les butylétains et les hydrocarbures pétroliers, sur un écosystème planctonique contrôlé met en évidence l'impact général d'un déplacement depuis des communautés dominées par de grosses diatomées vers des communautés dominées par des espèces plus petites, plus fréquemment des flagellés (Parsons et al. 1984, Harrison et al. 1986, Siron et al. 1996, Petersen & Gustavson 1998, 2000). Ceci a des implications importantes car, au fur et à mesure que la taille des producteurs primaires est réduite, le nombre de niveaux trophiques augmente; ceci diminue le rapport de prédateurs totaux et altère la structure des liens proie-prédateur. Les changements créés par les contaminants en phase avec les événements biologiques peuvent également causer des effets significatifs sur la dynamique des chaînes alimentaires aquatiques (Takahashi 1990).

Quant aux études disponibles sur la photomodification et la toxicité photoinduite des HAPs, elles ne se sont attardées que sur un ou deux composés bien spécifiques, et ne reflètent donc pas la situation environnementale naturelle. Pour le TBT, il n'existe encore aucune certitude quant à l'importance de la photo-dissociation sur le devenir de ce composé dans le milieu, et les rares études à ce sujet se sont limitées à des expériences en laboratoire. Les estimations sur les périodes de temps au cours desquelles les processus de dégradation du TBT prennent place sous différentes conditions naturelles sont rares. Les

demie-vies rapportées des organoétains sont souvent liées à des conditions expérimentales en laboratoire et ne sont pas directement transposables à l'environnement naturel. En effet, de nombreux facteurs déterminent la cinétique de dégradation de ces composés (i.e. rupture des liaisons chimiques), parmi lesquels l'intensité lumineuse (Hoch 2001). Toutefois, dans le contexte général de la diminution de la couche d'ozone et donc de l'augmentation du RUV-B, région dans laquelle ces composés sont susceptibles d'absorber l'énergie lumineuse, la photo-dissociation peut prendre toute son importance. Cette importance pourra être d'autant plus grande si les autres processus de biodégradation sont inhibés par le RUV-B; à savoir une altération de la fonctionnalité des communautés planctoniques naturelles.

Or, les travaux de Petersen & Gustavson (1998, 2000) ont démontré l'importance et l'utilité des mésocosmes dans la recherche écotoxicologique en mettant en évidence la sensibilité différentielle des cellules phytoplanctoniques au TBT. Ils ont ainsi souligné l'importance de la taille des cellules; la participation relative du nanophytoplancton dans la production primaire de la communauté phytoplanctonique diminuait tandis que celle du picophytoplancton augmentait. Ces changements reflètent les effets indirects du TBT, mais sans considération pour le RUV-B.

Dans le contexte de cette problématique générale, notre étude propose donc d'aborder l'action combinée du RUV-B et de certains contaminants dissous (i.e. butylétains et produits pétroliers) sur les premiers maillons du réseau trophique marin, et ce, à différentes latitudes. En effet, l'intensité du RUV-B étant fonction de la localisation géographique, il

est donc raisonnable de supposer que des organismes habituellement exposés à des niveaux élevés de RUV-B ont développé des mécanismes de résistance naturels pour contrer les effets dommageables de ce rayonnement. L'habitat et l'exposition antérieure au RUV-B jouent un rôle dans la détermination de la quantité de dommages dus à ce rayonnement énergétique. Dans les océans tropicaux, les algues sont soumises à un fort RUV-B et seraient moins vulnérables que les espèces présentes dans les eaux antarctiques (Helbling et al. 1992).

De même, la persistance des contaminants dans l'eau dépend en partie des facteurs biotiques et abiotiques (processus de dégradation, adsorption sur les particules, accumulation dans les organismes...). Cette persistance va dépendre de plusieurs facteurs environnementaux : la latitude, la présence ou non d'organismes capables de dégrader les composés chimiques présents, l'ensoleillement et les saisons de l'année influençant les températures de l'eau et de l'air. Ainsi, la température est un paramètre susceptible d'accroître la demie-vie des composés dans la colonne d'eau en ralentissant les processus responsables de son élimination. Des expériences en mésocosmes ont démontré que les températures relativement basses limitent la biodégradation du TBT (Adelman et al. 1990) et des hydrocarbures pétroliers (Siron et al. 1993), probablement en inhibant la croissance des microorganismes capables de dégrader ces composés.

La présente étude consiste donc à déterminer si la réponse des organismes planctoniques marins à l'augmentation du RUV-B est ou n'est pas influencée par la

présence simultanée de contaminants dissous, grâce à une approche de type pseudo-écosystémique (microcosme). Plus précisément, **cette étude cherche à quantifier et comprendre l'importance de la présence simultanée de contaminants dissous et d'une exposition au RUV-B sur la dynamique des communautés planctoniques côtières.** Une attention particulière sera portée sur les interactions possibles entre RUV-B et HAPs d'une part, et entre RUV-B et TBT d'autre part, afin d'évaluer l'importance des effets observés, à savoir des interactions antagoniste, additive ou synergique (Fig. 1). Cette interaction entre RUV-B et contaminants sera ainsi déterminée en terme de toxicité et d'impact, et cela aussi bien sur le phytoplancton que le bactérioplancton afin de répondre aux hypothèses de ce travail.

Sachant que le RUV-B peut engendrer une photomodification structurale des contaminants, et plus particulièrement des HAPs, et ainsi accroître leur potentiel de toxicité envers les organismes aquatiques *notre première hypothèse stipule que le RUV-B modifie de manière quantitative et qualitative la composition des hydrocarbures solubles et donc le potentiel de toxicité envers un assemblage planctonique naturel.* Une fois déterminée l'importance du RUV-B sur la photochimie de ces hydrocarbures, nous chercherons à mettre en évidence les interactions potentielles entre RUV-B et HAPs et ainsi à définir d'un point de vue écotoxicologique le sens de ces interactions (i.e. antagoniste, additive ou synergique) et l'impact écologique de ce double stress sur les premiers maillons du réseau trophique marin.

Une fois déterminées l'influence et l'interaction potentielle de cette co-exposition RUV-B accru et HAPs, nous testerons *une deuxième hypothèse selon laquelle la sensibilité d'un assemblage planctonique naturel face aux effets combinés du RUV-B et des HAPs varie en fonction de la latitude*. Nous comparerons ainsi deux milieux de latitudes moyennes : Rimouski (Canada 48.4°N, 68.53°W), région où les niveaux de RUV-B sont soumis à une forte variabilité annuelle et inter-annuelle, et où de nombreux modèles tendent à démontrer la formation d'un "trou" d'ozone Arctique comparable à celui observé au niveau du pôle austral, et Ushuaia (Argentine 54.8°S, 68.2°W), région où les assemblages planctoniques naturels sont maintenant soumis à l'impact de l'augmentation croissante du "trou" d'ozone au-dessus de l'Antarctique, aussi bien en superficie qu'en intensité.

Les mécanismes d'interactions entre RUV-B et HAPs font appel à des processus de photomodification et de photosensibilisation. Or la toxicité de certains contaminants comme le TBT ne semble pas être accentuée par de tels changements structuraux (i.e. peu ou pas de formation de photoproduits). Ainsi la réponse d'un assemblage planctonique naturel face à une co-exposition RUV-B/contaminant va également dépendre des caractéristiques physico-chimiques du composé anthropique en question et du rôle que le RUV-B peut avoir sur ces caractéristiques. Ainsi, *la troisième hypothèse de travail vise à déterminer l'impact du TBT en présence du RUV-B en terme de sensibilité des organismes, et non plus en terme de phototoxicité*. En effet, bien que le RUV-B puisse contribuer de manière significative à une diminution du potentiel de toxicité du TBT (i.e. débutylation en DBT et MBT), il peut également contribuer à une diminution du potentiel de

biodégradation des organismes aquatiques, en affectant les processus biologiques majeurs tels que la photosynthèse. De même, le TBT, considéré comme un puissant biocide, peut également contribuer à accroître la sensibilité de ces organismes face au RUV-B en affectant de manière irréversible les processus de réparation contre ce rayonnement.

La particularité de notre projet réside dans l'approche écotoxicologique en microcosmes qui, à notre connaissance, n'a jamais porté sur les effets combinés d'une augmentation du RUV-B avec la présence continue de butylétains et la présence sporadique de résidus pétroliers. Ces différentes hypothèses seront testées en évaluant différents paramètres biologiques.

CHAPITRE 1

NON-SYNERGISTIC EFFECTS OF WATER SOLUBLE CRUDE OIL AND ENHANCED ULTRAVIOLET-B RADIATION ON A NATURAL PLANKTONIC ASSEMBLAGE

Sargian P, Mostajir B, Chatila K, Ferreyra GA, Pelletier É, Demers S.

Sous presse dans la revue "Marine Ecology Progress Series"

RÉSUMÉ

La présente étude démontre les effets de la fraction soluble (WSF) d'un pétrole brut d'une part, du rayonnement ultraviolet-B accru (RUVB : 280-320 nm) d'autre part, et de la combinaison WSF+RUVB sur un assemblage planctonique naturel ($< 150 \mu\text{m}$) de l'Estuaire du Saint-Laurent. Afin d'étudier aussi bien les effets individuels de chacun de ces stress que leurs effets combinés, 12 microcosmes (9 l) ont été immergés dans la colonne d'eau de mésocosmes plus grands (sacs en polyéthylène : 1800 l), donnant lieu aux 4 traitements expérimentaux suivants, chacun en triplicata : (1) NUVBR+WSF (RUVB naturel avec addition de la WSF), (2) HUVBR+WSF (RUVB accru avec addition de la WSF), (3) NUVBR (RUVB naturel sans WSF), et (4) HUVBR (RUVB accru sans WSF). Pendant 5 jours consécutifs, nous avons mesuré le rayonnement incident, les concentrations en éléments nutritifs et en hydrocarbures dissous, ainsi que les changements temporels de la production et de l'abondance du phyto- et bactérioplancton. Nous avons ainsi pu observer un fort impact de la WSF et un impact moindre du RUVB sur l'assemblage phytoplanctonique avec une diminution des taux de croissance, accompagnée par une augmentation de la taille cellulaire moyenne, reflétant une perturbation du cycle de division cellulaire. En se référant au traitement NUVBR, ces résultats ont conduit à une réduction de 84, 79 et 60% dans l'abondance totale des cellules $< 20\mu\text{m}$, et cela dans les traitements HUVBR+WSF, NUVBR+WSF et HUVBR respectivement. Les abondances bactériennes ont montré des valeurs significativement plus importantes dans les deux traitements contaminés avec l'addition de la WFS, et cela comparativement au traitement NUVBR.

Cependant, l'incorporation bactérienne de thymidine a montré des variations nycthémerales, suggérant des dommages cumulatifs à l'ADN induits par le RUVB et/ou la WSF, ainsi que l'existence potentielle de mécanismes de réparation avec la co-occurrence d'une plus grande disponibilité en substrats de croissance. L'absence de différences significatives entre les deux traitements contaminés par la WSF suggèrent qu'il n'y a pas eu d'interaction d'addition entre le RUVB et la WSF. Cette étude apporte la première évidence de l'interaction non-synergique entre les deux stress et suggère que sous l'importance des effets délétères de la WSF, les effets induits par le RUVB sur les microorganismes marins peuvent être complètement masqués.

Mots-clés : rayonnement ultraviolet•hydrocarbures dissous•effet non-synergique•phytoplancton•bactéries.

ABSTRACT

The present study demonstrates the effects of the Water Soluble Fraction (WSF) of a crude oil, enhanced ultraviolet-B radiation (UVBR: 280-320 nm), and the combination of WSF and enhanced UVBR on a natural planktonic assemblage (<150 μm) isolated from the lower St. Lawrence Estuary. To study the separate and dual effects of WSF and UVBR, 12 microcosms (9 l) were immersed in the water column of larger mesocosms (polyethylene bags; 1800 l), providing 4 treatments, each in triplicate: (1) NUVBR+WSF (natural UVBR with WSF), (2) HUVBR+WSF (enhanced UVBR with WSF), (3) NUVBR (natural UVBR without WSF), and (4) HUVBR (enhanced UVBR without WSF). During 5 d we monitored the incident radiation, WSF and nutrient concentrations, abundance and production of heterotrophic bacteria and phytoplankton. Strong deleterious effects of WSF and lower effects of UVBR were observed on the phytoplanktonic assemblage with a decrease of growth rates, accompanied by an increase of mean cell size which reflected a perturbation of the cell division cycle. Using NUVBR as reference conditions, the above effects resulted in a reduction of 84%, 79% and 60% of total abundance of phytoplankton fraction <20 μm in HUVBR+WSF, NUVBR+WSF and HUVBR treatments, respectively. Significant higher values of bacterial abundances were observed in the WSF-added treatments comparatively to NUVBR without WSF. However, bacterial thymidine incorporation exhibited diel variations, suggesting cumulative UVBR-induced DNA and/or PAHs-induced DNA damages, and possible repair mechanisms with the co-occurrence of more available growth substrates from stressed phytoplankton. The absence of significant differences between

both WSF-added treatments under the two different UVBR conditions suggests that there is not additive interaction between WSF and UVBR. This study provides therefore the first evidence of a non-synergistic interaction between both stresses and suggests that under strong deleterious effects of soluble petroleum hydrocarbons, the UVBR-induced effects on marine microorganisms can be completely masked.

Keywords: ultraviolet radiation•dissolved hydrocarbons•non-synergistic effect•phytoplankton•bacteria

INTRODUCTION

Solar UV-B radiation (UVBR: 280-320 nm) reaching the Earth's surface has increased during recent years due to ozone depletion and this has prompted research on their effects on phyto- and bacterioplankton assemblages due to their importance in the global carbon cycle. Several investigations have shown that UVBR inhibits phytoplankton photosynthesis (Vincent & Roy 1993, Bergmann et al. 2002), growth and cell division (Karentz et al. 1991, Buma et al. 1997, Mostajir et al. 1999a), nutrient uptake (Fauchot et al. 2000, Mousseau et al. 2000), and induces changes in algal specific composition (Neale et al. 1994, Mostajir et al. 1999a,b, Wängberg et al. 2001). Bacterioplankton is also affected by UVBR in several ways, including a reduction in bacterial production (Aas et al. 1996, Chatila et al. 2001), as well as in their abundance (Müller-Niklas et al. 1995) and viability (Vincent & Roy 1993). Such planktonic responses to enhanced UVBR are species-specific due to difference in UVBR sensitivity (Neale et al. 1998). Moreover, planktonic response may differ according to the latitude (Longhi 2003). Indeed, UVBR shows a high variability, and particularly due to changes in solar elevation with latitude. It is therefore expected that cells are more or less UVBR-sensitive, depending on their light environment (Helbling et al. 1992).

On the other hand, recent environmental work has focused on the toxicity induced by simultaneous exposure to natural solar radiation and environmental contaminants (Liess et al. 2001). For example, it has been demonstrated that aquatic ecosystems may be

impaired through the light-mediated phototoxicity of light polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present in the water soluble fraction (WSF) of crude oil (Marwood et al. 1999). Photoactivation of PAHs by natural irradiance, especially UVBR, is one of the most important routes of their enhanced toxicity in marine environment (Huang et al. 1993, McConkey et al. 1997). Such photoinduced toxicity results from photosensitization (with reactive oxygen species formation) and photomodification (defined here as photooxidation and/or photolysis) processes. In the latter, photoproducts formation occurs, and these new compounds are considered to be more toxic than initial compounds (McConkey et al. 1997, Mallakin et al. 1998).

Combined and/or synergistic effects of PAHs and UVBR exposure are therefore highly relevant in ecotoxicology, because PAHs are a prevalent group of organic contaminants in surface waters (OSB 2003). Moreover, according to current predictive models, ozone depletion will continue to occur in 2010-2019, with a likely ozone hole perhaps as big as the present one over Antarctica but over the North Pole (Schindell et al. 1998). It was therefore interesting to assess the planktonic assemblage responses to dual stresses and to determine whether these responses differ according to the latitude. In this context, a series of mesocosms experiments were conducted at two latitudes: northern temperate (Rimouski; Canada), and southern temperate (Ushuaia; Argentina), periodically exposed to ozone hole conditions. We present here the first part of these results, which corresponds to the study of the effects of UVBR and WSF (dissolved PAHs) on a natural planktonic assemblage from the St. Lawrence Estuary (Rimouski, Canada).

In the present investigation, we tested the hypothesis that elevated UVBR levels induced by the ozone depletion in northern latitudes could enhance the toxicity of the water soluble fraction (WSF) of crude oil released in the euphotic layer of coastal waters in the few hours and days following an oil spill event. An outdoor microcosm approach was adopted to provide information on the interactive toxicity of the WSF and enhanced UVBR on the lower St. Lawrence Estuary planktonic assemblage. A series of measurements was undertaken to characterize chemical and biological changes that occurred in the first five days after the introduction of WSF, such as hydrocarbons content, phytoplankton dynamics, as well as the bacterial abundance and productivity.

MATERIAL AND METHODS

Experimental set-up

Results reported here are part of a study using larger mesocosms designed to determine the effects of increased UVBR levels on a natural planktonic assemblage of the lower St. Lawrence Estuary. For this general purpose, the experimental set-up (Fig. 1), consisted of 6 mesocosms (2.3 m deep, volume of ~1800 l) made of clear polyethylene bags that transmitted 85% to 93% of irradiance between 280 nm and 750 nm. The bags were immersed in the water column and attached to a wharf structure in a marina on the south shore of the lower St. Lawrence Estuary, Québec, Canada (48.6°N; 68.2°W).

Mesocosms were exposed in triplicates to one of the following UVBR regimes: natural UVBR (NUVBR), and high UVBR enhancement (HUVBR). UVBR enhancement was achieved using four fluorescent light tubes (Philips TL40W-12RS) with an emission peak at 313 nm. They were turned on from 10:00 to 15:00 h each day. Shorter wavelengths emitted by the tubes and not part of natural radiation (UVCR, < 280 nm) were screened out by mean of 0.13 mm cellulose acetate films (Cadillac plastic) which were changed daily. To ensure equal shading effects, dummies for the tubes holders were placed over NUVBR treatments. Clear polyethylene sheets were placed over each mesocosm during night to prevent rainwater intrusion in mesocosms. Seawater was sampled in June 17th 2000 from

the St. Lawrence Estuary (48.3°N, 68.3°W) at 5 m depth, using a zooplankton water pump (Gorman-Rupp Ltd., model 13D-19), and then transported by ship to the experimental site. Upon arrival at the marina, all six mesocosms were filled simultaneously. Larger zooplanktonic organisms and debris were discarded from the mesocosms by screening water through a 500 μm Nitex™ mesh. To ensure homogeneity within each mesocosm throughout the experiment, water was continuously mixed from the bottom to the top using a Little Giant® pump (model 2-MD-HC) at a flow rate of 25 l min⁻¹.

To reach the specific objectives of the present research, the experiment was carried out during a 5-day period from the 20th to 24th of June 2000, using twelve microcosms (9l-cylindrical Teflon® bags: 75 cm height \times 25 cm width) (Fig. 1). Mesocosms were submitted to the experimental light conditions during two days (18 and 19th June) before microcosms experiment started. Then seawater (filtered through a 150- μm net to exclude large grazers) was transferred to the microcosms and WSF added. Two microcosms were immersed at the centre of each triplicated mesocosm for both NUVBR and HUVBR treatments, and filled with water from respective mesocosms. One of the microcosm received WSF, and the other one was kept without dissolved hydrocarbons. A total of six microcosms were exposed to NUVBR and six others were exposed to HUVBR. Microcosms were identified owing to their light condition and WSF addition (or not): (i) NUVBR and HUVBR for microcosms without dissolved hydrocarbons, respectively and, (ii) NUVBR+WSF and HUVBR+WSF for microcosms with dissolved hydrocarbons added under NUVBR and HUVBR levels, respectively. Before each sampling, microcosm content

was manually homogenized. The water samples were siphoned out at half-depth of the water column of each microcosm twice per day.


Physical measurements in the mesocosms

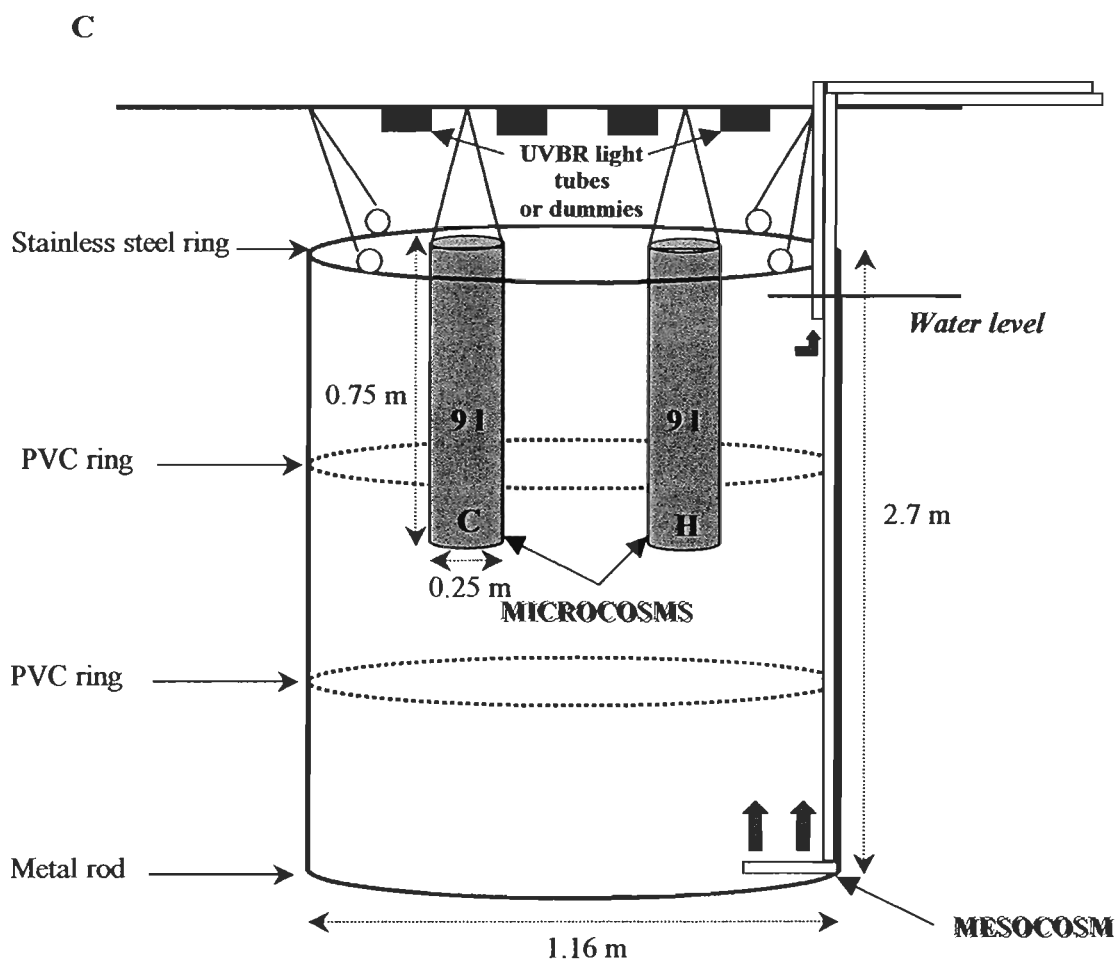
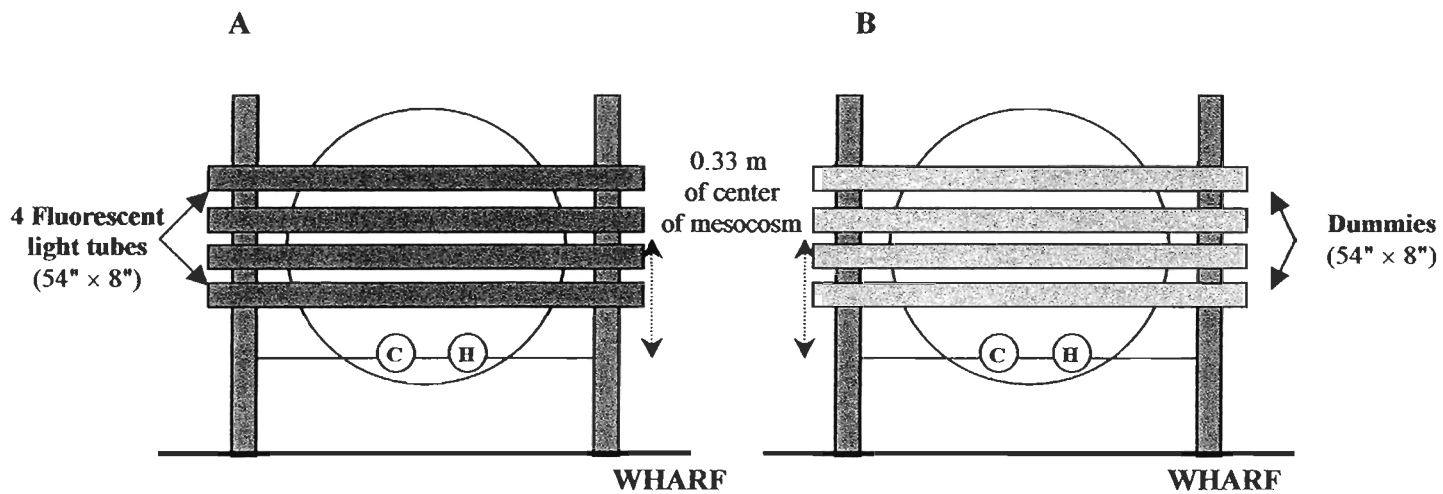
The incident radiation at 313, 320, 340 and 380 nm was recorded every 10 min using a GUV surface radiometer (Biospherical Instruments). Vertical light profiles were also performed at the centre of each mesocosm three times a day (at 10:00, 12:00 and 14:30 h) using a PUV-500 underwater radiometer (Biospherical Instruments). The PUV-500 provided a measurement of the cosine-corrected downwelling irradiance in 4 discrete channels in the UVR range (313, 320, 340 and 380 nm) and PAR. Irradiance was corrected by the dark values and normalized to the ambient conditions at the beginning of the profile, using ambient values given by the GUV. The attenuation coefficient ($K_d(\lambda)$, m^{-1}) was assessed in each mesocosm using the relationship:

$$K_d(\lambda) = \ln(E_d0(\lambda)/E_dz(\lambda)) / \lambda z$$

where $E_d0(\lambda)$ and $E_dz(\lambda)$ are incident irradiances beneath the water surface and at depth z at the wavelength λ , respectively.

Figure 1. Schematic view of the experimental set-up. Top view showing the position of microcosms inside the mesocosms in (A) HUVBR and (B) NUVBR treatments. (C) Vertical view demonstrating the position of microcosms in the water column of the mesocosms.

(): intake and outflow of the water circulation pump; C: microcosms without hydrocarbons; H: microcosms with hydrocarbons.



Chemical measurements in the microcosms

Oil contamination - Crude oil used in this study was a light Forties crude oil originating from North Sea oil fields (specific gravity of 0.839 g cm^{-3} , viscosity of 10 cSt at 10°C following API (1986)). To prepare the WSF, 35 ml of crude oil were floated over 3.5 l of filtered ($0.45\ \mu\text{m}$) seawater into a carefully pre-cleaned glass jar. The jar was sealed and mixture stirred slowly for 48 h at 20°C without disturbing the oil/water interface. The stirring speed was adjusted so that the vortex depth did not extend 25% of the distance to the bottom of the jar. The underlying water phase (considered as the 100% WSF hereafter) was siphoned with caution to avoid any oil droplets to be sampled, WSF was quantified as described below, and then added on day 3 to experimental microcosms to yield a final concentration of $11\ \text{mg l}^{-1}$.

Oil chemical analysis - Water samples (200 ml) were collected three times during the experiment (days 3, 5 and 7) in each microcosm with WSF added. To measure partitioning into the water column, both dissolved (i.e. passing through $0.7\ \mu\text{m}$ Whatman GF/F filter) and particulate phases (i.e. retained on the filter) were immediately and separately extracted twice with dichloromethane (DCM) following Siron & Giusti (1990). Total aromatic hydrocarbons were analyzed by measuring the fluorescence of the extracts with a Perkin-Elmer LS 50B luminescence spectrometer, using quartz cell and the synchronous excitation-emission technique (Wakeham 1977). Excitation-emission scans were made on

the samples of interest to determine the general fluorescence characteristics of the hydrocarbons present. Excitation and emission monochromators were offset by 25 nm, and the emission between 250-500 nm was recorded.

Thereafter, total extracts were cleaned onto microcolumn (Supelclean™ ENVI™ – 18 SPE Tubes 3 ml, SUPELCO). Aromatic hydrocarbons were eluted with 8 ml of hexane:DCM (90:10) and the eluate concentrated under nitrogen flux to 0.1 ml. These extracts were analyzed with a gas chromatograph/mass spectrometer (GC/MS) Finnigan POLARIS Q (Thermo Quest) using a fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d; Restek-5MS) with helium as carrier gas. Mass spectral data were collected over a scan range of 50 to 650 atomic mass units in the total ion mode. The initial WSF used in microcosms was also analyzed with GC/MS. The reproducibility of the analytic method was tested with 7 successive injections of deuterated PAHs (d-10 anthracene and d-10 pyrene). The relative standard deviation (RSD) was 1.42%.

Nutrients - Samples for nutrients (dissolved nitrate+nitrite, phosphate and silicate) were collected daily (7:00 h), filtered through pre-combusted Whatman GF/F filters and stored at -80°C until analysis with a Technicon II™ autoanalyser system, according to Parsons et al. (1984).

Biological measurements in the microcosms and calculations

Chlorophyll a - To determine total chlorophyll *a* (Chl *a* >0.7 μm) concentrations, 100 ml of seawater samples were filtered each day (7:00 h) onto Whatman GF/F filters and measured with a 10-005R Turner Designs fluorometer, following a 24 h extraction in 90% acetone at 4°C (Parsons et al. 1984).

Flow cytometric analysis of phytoplankton - Flow cytometric analysis of phytoplankton cells (<20 μm) collected at 07:00 and 15:00 h was performed during the experiment using a FACSort analyser flow cytometer (FCM, Becton-Dickinson) fitted with a 488 nm laser beam. Only the abundance and forward angle light scatter (FSC; related to the particle size) of phytoplankton <20 μm are reported in this study. The FSC and fluorescence signals were calibrated just before analysis using Fluoresbrite beads (Polyscience, Inc) of 2, 10 and 20 μm as internal standards. Phytoplankton cells were detected using natural red fluorescence (FL3 > 650 nm), which is attributed to Chl *a*. Data were logged using Cell Quest® and then analyzed with Attractor® softwares, both from Becton-Dickinson.

Based on the exponential increase in the abundance observed under natural condition (NUVBR treatment), growth rates (k, d^{-1}) were calculated for the period between day 4 and the end of the experiment as follow:

$$k = \frac{\ln N_{D7} - \ln N_{D4}}{D7 - D4}$$

Where N_{D7} and N_{D4} are cell numbers at final time D_7 and initial time D_4 of the exponential phase observed under NUVBR treatment, respectively.

Bacterial enumeration and activity (³H-thymidine incorporation) - Bacterial counts were done from samples stained with 4'6 diamidino-2-phenolindole, DAPI (Sigma). First, 10 ml of samples were placed onto a 25 mm diameter filtration apparatus fitted with 0.2 μm pore size black polycarbonate membrane filters (Poretics). Upon filtration of approximately half of the sample, 50 μg l⁻¹ DAPI was added to the concentrate residuals and held in dark for 30 min. After filtration to dryness, dry filters were mounted on slides with a drop of immersion oil. Bacterial abundances were then counted using a Zeiss® epifluorescence microscope.

To assess bacterial productivity, the use of radiolabelled precursor molecules such as ³H-thymidine is a common method (TdR; Fuhrman & Azam 1982). The method is based on the assumption that exogenously supplied ³H-TdR is taken up by actively growing bacteria and incorporated into DNA, and therefore used to estimate DNA synthesis (Aas et al. 1996). Thus, bacterial production was measured using the ³H-TdR (Sigma; specific

activity 3.7×10^7 Bq ml⁻¹ or 1.0 mCi ml⁻¹) incorporation technique according to Smith & Azam (1992), and using microcentrifugation instead of filtration. From each microcosm, samples were taken at 7:00 and 15:00 h during each day of the experiment, inoculated with ³H-TdR and incubated at ambient temperature in the laboratory for 1 h. Glutaraldehyde was then added to stop the reaction. Samples were processed immediately after the end of incubation and checked for DPM counts using a Beckman Liquid scintillation system 3801 Series. Sample activity was converted into volume dependant rates of thymidine incorporation (Total activity, TA; pmol TdR l⁻¹ h⁻¹) according to Furhman & Azam (1982). The TA was normalized to bacterial abundance to estimate the cell-specific incorporation of ³H-TdR (Specific activity, SA: pmol TdR cell⁻¹ h⁻¹).

Statistical analyses

A repeated-measure multivariate analysis of variance (MANOVA) was conducted to assess time effects and time × treatment interactions on different parameters measured (Scheiner & Gurevitch 1993). MANOVA requires multivariate normality and homogeneity of covariance matrices. Preliminary data using the Kolmogorov-Smirnov test indicated that all data fit a normal distribution. For the latter assumption, even after logarithmic transformation to normalize the residuals and homogenize variances, the symmetry of the covariance matrices did not meet this assumption of MANOVA for some parameters and so the *F* statistics are inflated. Then, the standard provision is to reduce the degrees of freedom

in the F test, and the Huynh-Feldt (H-F) adjustment was applied, and therefore H-F corrected p values were used (Scheiner & Gurevitch 1993).

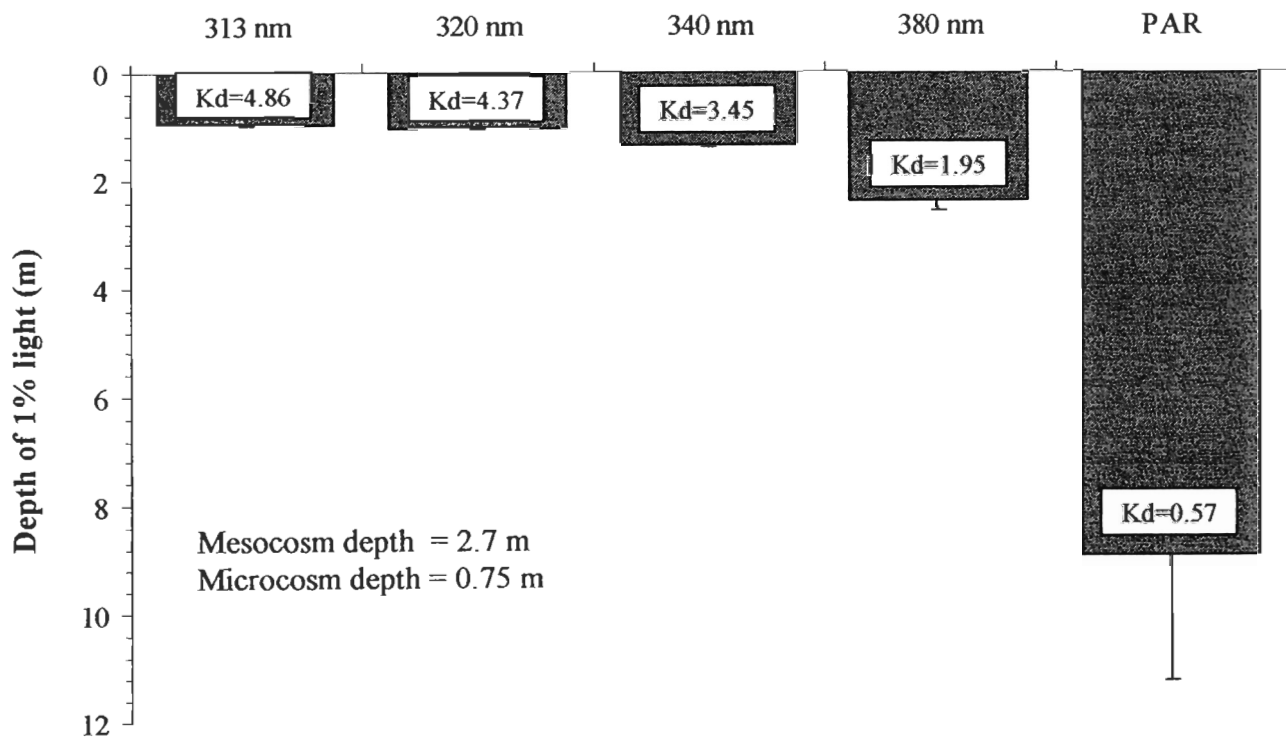
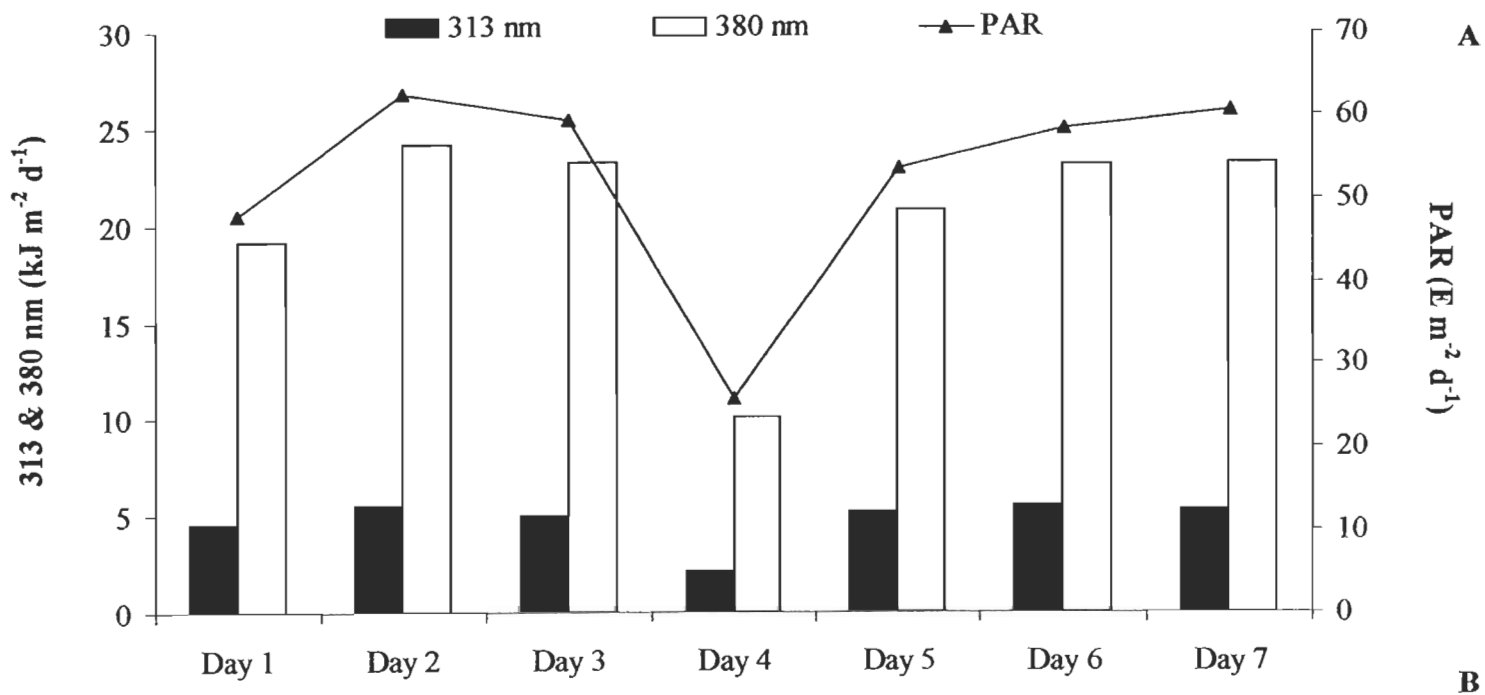
Thereafter, a two-factor ANOVA (UVBR and WSF) was applied within each day to determine the signification of the differences among means as well as the singificance of interactions (UVBR \times WSF; time independent). Then, a post-hoc pairwise multiple comparisons Tukey test was performed at each sampling time in order to detect significant differences between treatments and depict possible combined effects between UVBR and dissolved hydrocarbons.

RESULTS

Light and UVBR irradiances

The general meteorological conditions are described using the data provided by a GUV instrument (data of 313 nm, 380 nm, and the PAR range). During this experiment, we observed six days of clear sky, and one day 100% cloudy (Day 4) (Fig. 2A). The planktonic assemblage received the same proportion of the daily incident irradiance under the four different treatments. The daily-integrated radiation doses (natural or enhanced) received just below the water surface are given in Table 1 for different UV radiation wavelengths. Compared to the NUVBR treatment, the enhancement provided by lamps was highest for the shorter wavelengths and decreased with the increase in wavelengths. The average enhancement at 313 nm ($1.25 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) was higher than at 320 nm ($1.17 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) and far higher than at 380 nm ($0.51 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). The mean enhanced UVBR levels in the HUVBR treatments, based on 313 nm wavelength, was calculated by subtracting the value of the 313 nm wavelength observed in the NUVBR from those measured in the HUVBR treatments. The mean unweighted 313 nm in HUVBR treatments was 1.59-fold higher than that in the NUVBR treatments.

Figure 2. (A) Daily integrated incident irradiance at 313 nm and 380 nm, and PAR measured over the 7-d period of the experiment shown to illustrate the general meteorological conditions. (B) Apparent attenuation coefficients (K_d , m^{-1}) for 313, 320, 340 and 380 nm and PAR as derived from irradiance depth profiles in the mesocosms. The corresponding depth (m, \pm SD) of 1% near surface irradiance (0 m) at each wavelength is indicated by the bars.



To support the biological significance of the lamps enhancement, the biological weighting function (BWF) of Cullen et al. (1992) was applied (Table 2). For this, 313 nm value was scaled to the whole light spectrum. Compared to the NUVBR treatment, the weighted irradiance in the 280-320 nm range was 2.15-fold greater in HUVBR treatment.

K_d values did not vary significantly among mesocosms during the experiment. UVR attenuation coefficients (K_d , m^{-1}) ranged from 4.86 (313 nm) to 1.95 m^{-1} (380 nm), with mean depths of 1% of surface irradiance of 0.95 (313 nm), 1.05 (320 nm), 1.34 (340 nm), and 2.38 m (380 nm) (Fig. 2B).

Chemical parameters

Oil contamination - Synchronous fluorescence spectra obtained for the Forties crude oil and WSF (Fig. 3) clearly show that the WSF essentially consisted of mono- and di-aromatics with a low contribution from heavier compounds. Maximum fluorescence emission around 320 nm is characteristic of naphthalene and alkylated analogs. Synchronous fluorescence spectra of samples (Fig. 4) exhibit clear differences with respect to UVBR treatments and elapsed time. Under HUVBR+WSF treatment (both dissolved and particulate samples), fluorescence spectra showed a relative enrichment in small and fluorescent compounds (located approximately between 260 and 280 nm) which was not observed under NUVBR+WSF treatment. Changes were time dependent, as illustrated by

particulate fractions collected in HUVBR (panel D). This shift in fluorescence emission and its intensity could be indicative of a drastic change in the chemical composition of the WSF with the loss of major light PAHs and the possible generation of new aromatic moieties fluorescing in shorter wavelengths.

GC/MS analysis confirmed the above findings and revealed that WSF generated by Forties crude oil was mainly formed by naphthalenes (over 97% of total) as identified by their mass spectra (Table 3). These results support and explain initial WSF spectra obtained by fluorescence (Fig. 3, and Fig. 4, profile a). As expected from their low water solubility, *n*-alkanes have not been detected in WSF. The level of monomethyl-naphthalene was approximately three times the level of naphthalene itself and represented around 54% of the total PAHs in WSF. Heavier PAHs were also present in WSF, but in relative small amounts.

Fluorene, anthracene, phenanthrene and its alkylated homologs were identified, but fluoranthene and pyrene were not detected. Naphthalene and other aromatics were not detected in samples extracted during the course of the experiment because of their very low concentrations (naphthalene method limit detection = $4.5 \times 10^{-3} \mu\text{g l}^{-1}$; Table 3).

Table 1. Mean integrated daily irradiances at 313, 320, 340, and 380 nm, for sunny days just below water surface in NUVBR and HUVBR treatments.

λ	NUVBR	HUVBR
(nm)	(kJ m ⁻² d ⁻¹)	(kJ m ⁻² d ⁻¹)
313	2.15 ± 0.14	3.40 ± 0.11
320	3.42 ± 0.34	4.59 ± 0.28
340	7.36 ± 0.61	8.27 ± 0.58
380	8.78 ± 0.75	9.29 ± 0.74

Table 2. Relative irradiance increase in HUVBR treatment using four fluorescent light tubes compared to relative increase of irradiance associated with ozone depletion over Antarctica. The spectral irradiance was weighted with the BWF for inhibition of photosynthesis in the temperate latitude diatom *Phaeodactylum* sp. (Cullen et al. 1992).

	incident solar irradiance at McMurdo**	HUVBR
Unweighted UVBR (W m^{-2})	1.06	1.59
BWF for inhibition of photosynthesis (Cullen et al. 1992) (W m^{-2})	1.24	2.15

* Data were provided by a PUV-500 underwater radiometer

** From Cullen & Neale (1997)

Figure 3. Synchronous fluorescence spectra of the Forties crude oil (—), initial WSF (—), and initial sampling water (—). Assignment of major peaks from Wakeham's data (1977). Scan excitation-emission wavelengths: 250-500 nm.

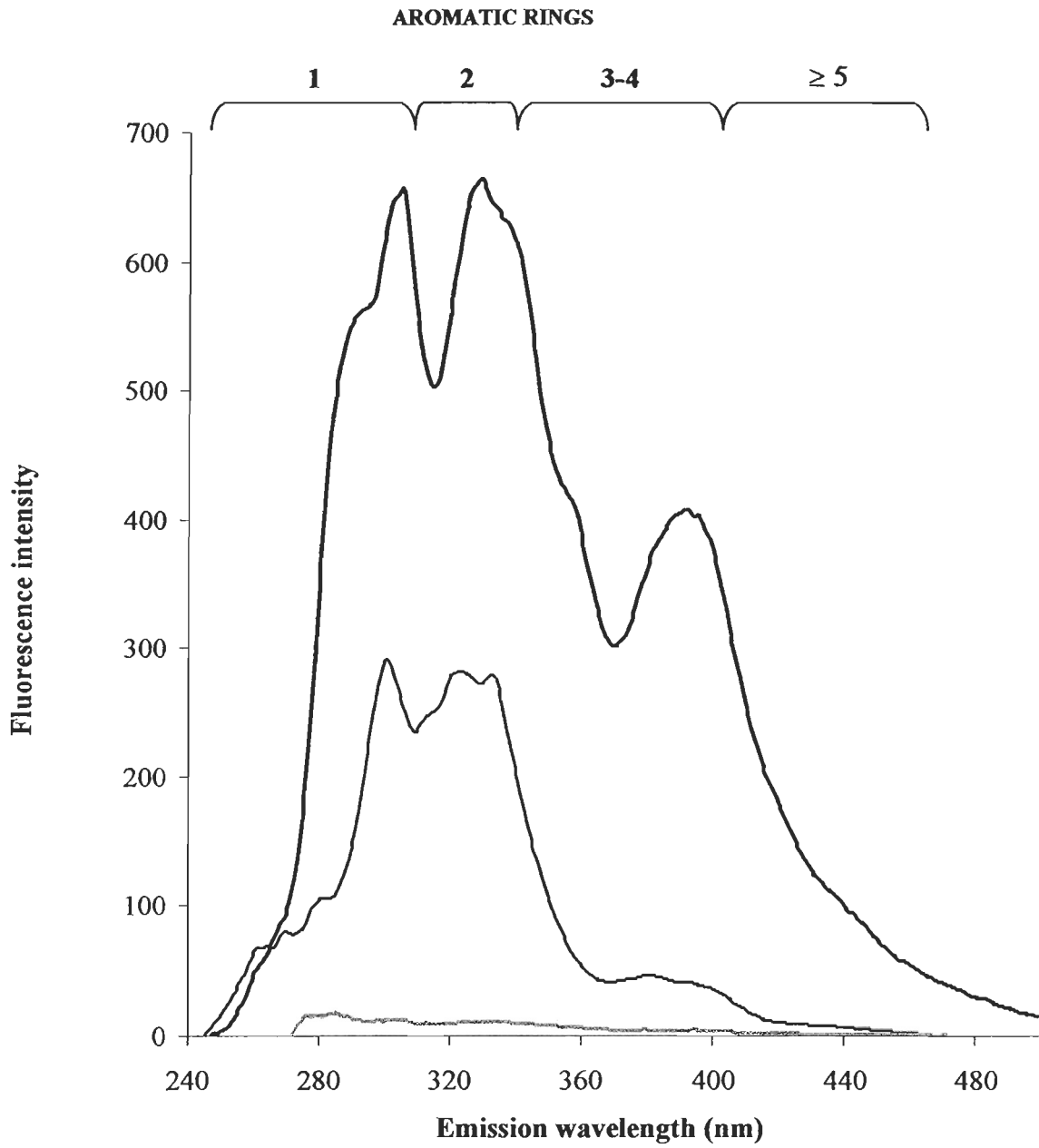


Figure 4. Synchronous fluorescence spectra of total dissolved hydrocarbons in (A) NUVBR+WSF, and (B) HUVBR+WSF treatments, and particulate hydrocarbons in (C) NUVBR+WSF, and (D) HUVBR+WSF treatments. a: initial WSF, b: day 3, c: day 5, and d: day 7 of the experiment.

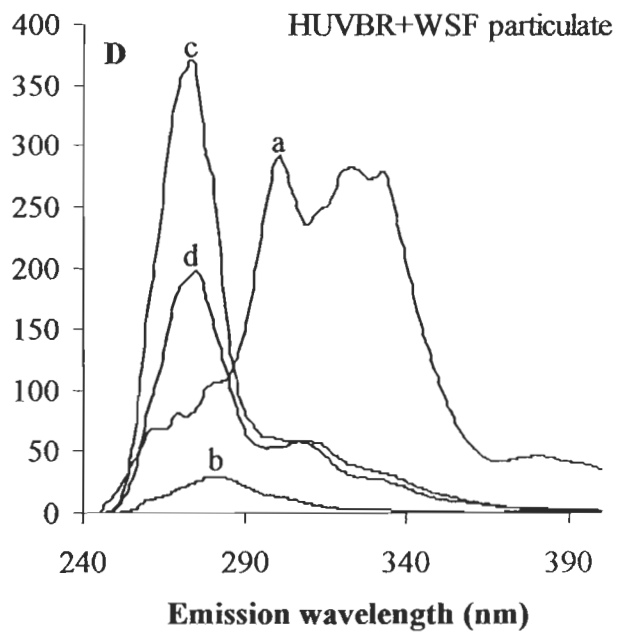
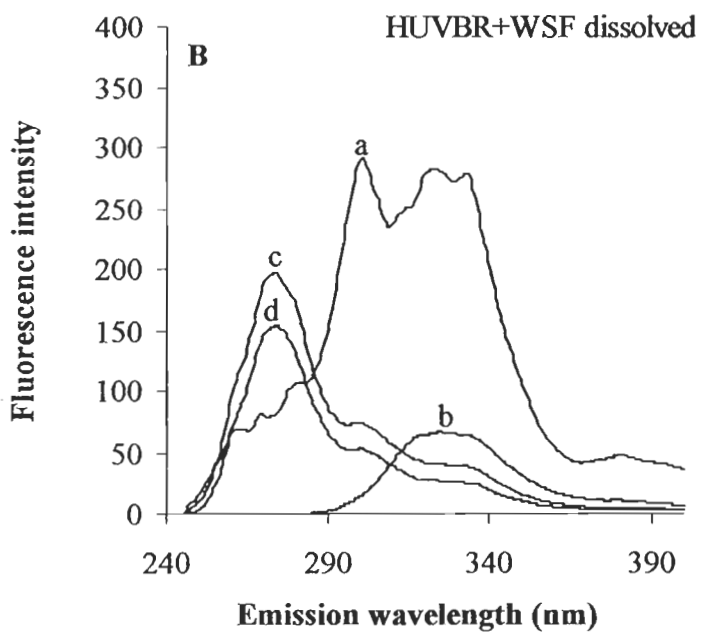
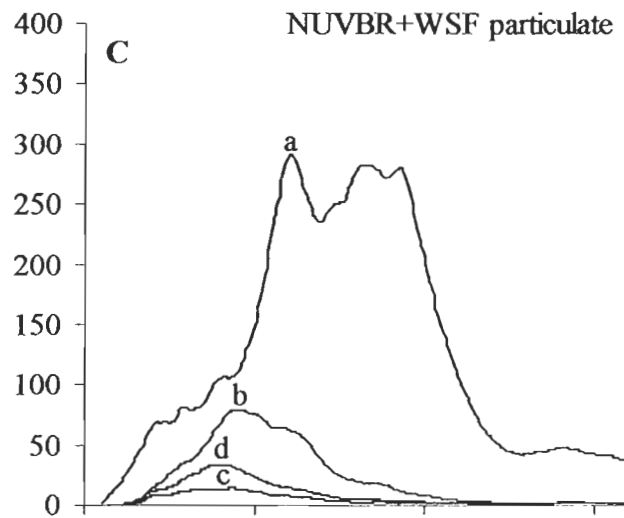
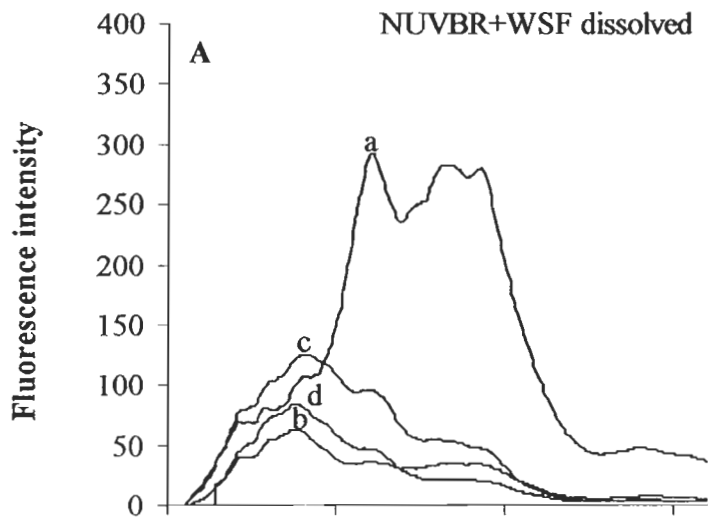


Table 3. Compounds identified in the initial WSF from the crude oil Forties before addition in microcosms.

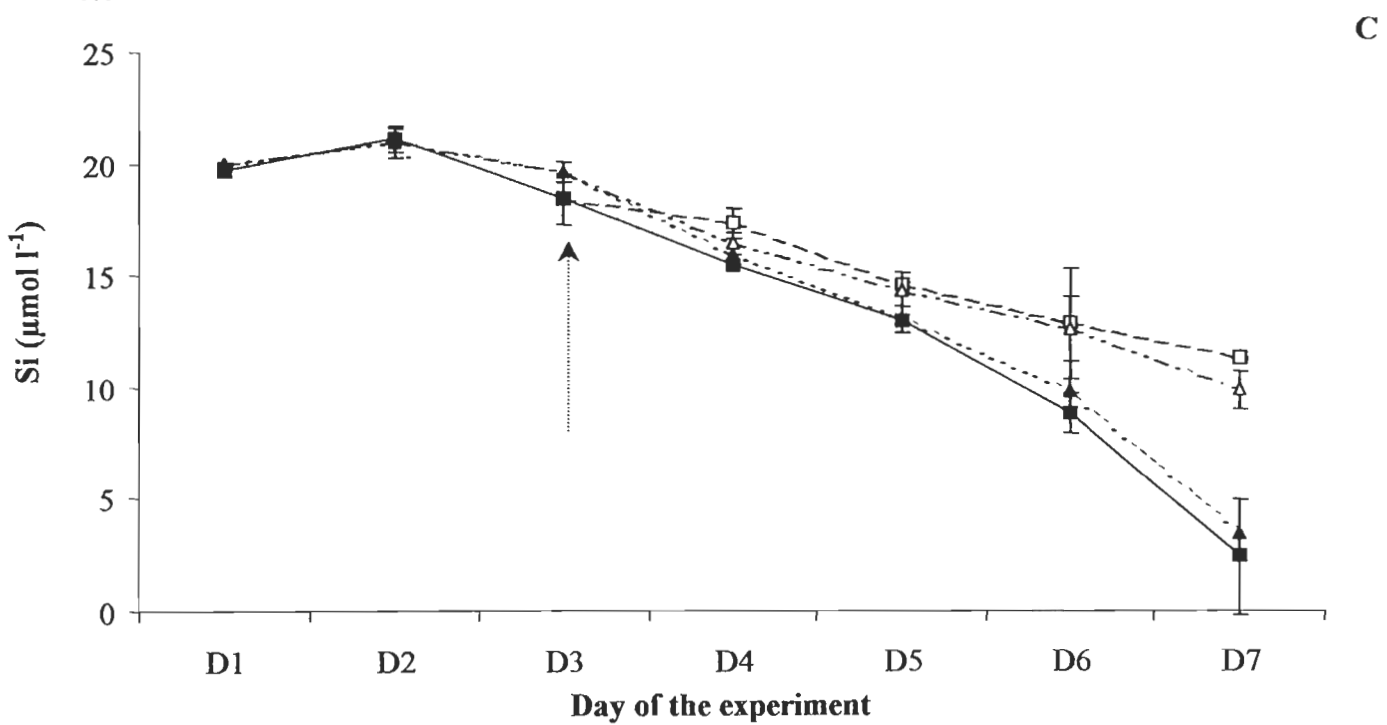
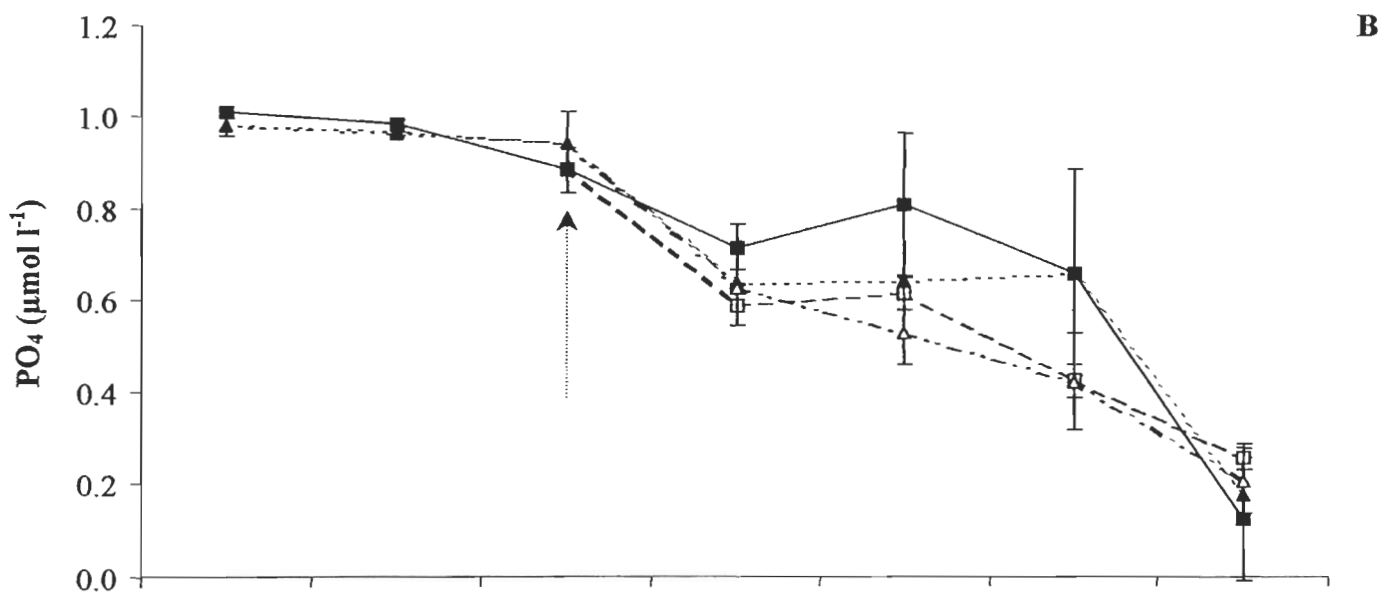
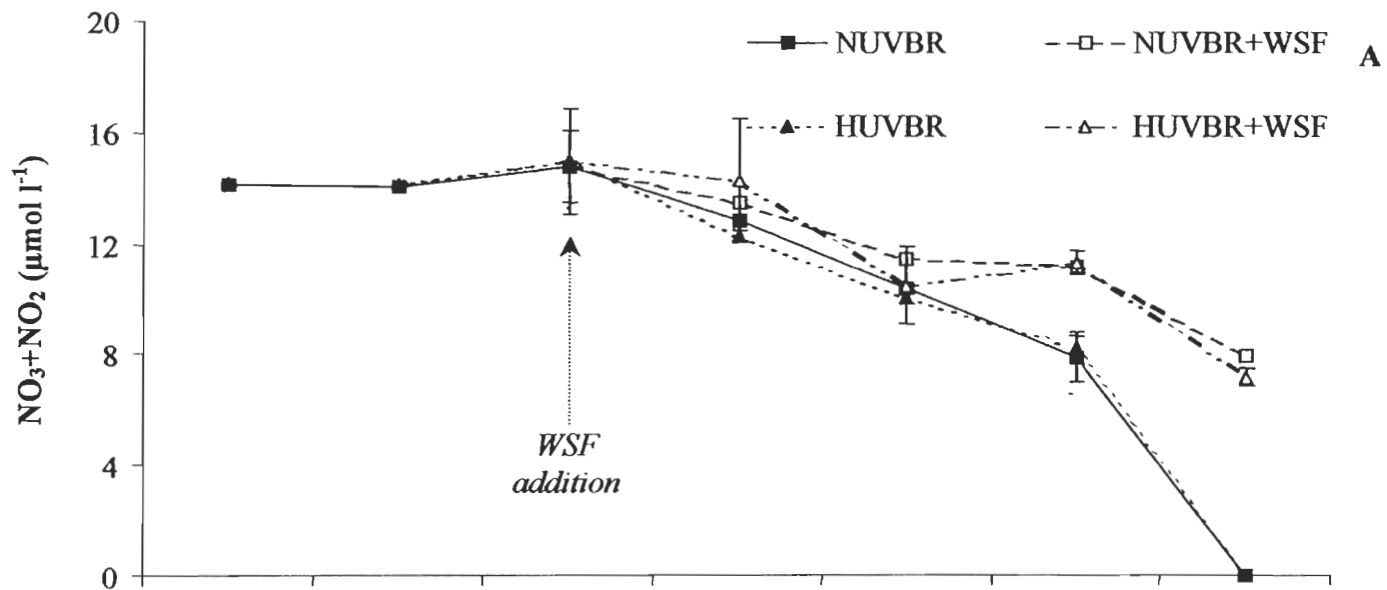
Compounds (initial WSF)	ring (number)	m/z (target ion)	Concentrations $\mu\text{g l}^{-1}$	MDLs^a $\mu\text{g l}^{-1} (\times 10^{-3})$
Naphthalene	2	128	4.33	4.500
C1-Naphthalene	2	142	10.028	15.000
C2-Naphthalene	2	156	1.290	15.000
C3-Naphthalene	2	170	2.49	15.000
C4-Naphthalene	2	184	0.056	15.000
Fluorene	3	166	0.085	5.300
Anthracene	3	178	0.111	5.100
Phenanthrene	3	178	0.132	5.700
C1-Phenanthrene	3	192	0.047	15.000
C2-Phenanthrene	3	206	0.029	15.000
C3-Phenanthrene	3	220	0.000	15.000
Fluoranthene	4	202	0.000	6.700
Pyrene	4	202	0.000	6.900
Total PAHs			18.598	

^amethod detection limits

Nutrients - Nitrate+nitrite concentrations decreased from $14.15 \pm 0.05 \mu\text{mol l}^{-1}$ to $10.52 \pm 0.85 \mu\text{mol l}^{-1}$ from day 1 to day 5 without any significant differences between treatments (Fig. 5A). Results from MANOVA showed that Day \times WSF had a significant effect ($p < 0.001$), whereas no Day \times UVBR effects were recorded ($p > 0.05$). On days 6 and 7, significant differences ($p < 0.05$) appeared when nitrate+nitrite concentrations fell below $0.012 \mu\text{mol l}^{-1}$ (detection limit) for NUVBR and HUVBR without WSF, whereas much higher concentrations (7.96 ± 0.25 and $7.18 \pm 0.32 \mu\text{mol l}^{-1}$) remained in NUVBR+WSF and HUVBR+WSF, respectively.

Phosphate concentrations, measured at the beginning of the experiment were $0.99 \pm 0.02 \mu\text{mol l}^{-1}$ with no significant differences between treatments until day 5 ($0.63 \pm 0.12 \mu\text{mol l}^{-1}$) (Fig. 5B). As MANOVA only detected a Day \times WSF effects ($p < 0.05$), thereafter, a significant difference was only observed on day 6 between treatments without dissolved hydrocarbons ($0.66 \pm 0.23 \mu\text{mol l}^{-1}$ for NUVBR and $0.66 \pm 0.07 \mu\text{mol l}^{-1}$ for HUVBR) and treatments with dissolved hydrocarbons ($0.43 \pm 0.11 \mu\text{mol l}^{-1}$ for NUVBR+WSF and $0.42 \pm 0.04 \mu\text{mol l}^{-1}$ for HUVBR+WSF). Final phosphate concentrations ranged between $0.13 \pm 0.02 \mu\text{mol l}^{-1}$ and $0.26 \pm 0.03 \mu\text{mol l}^{-1}$ without any significant differences between all treatments.

Figure 5. Temporal changes of (A) nitrite + nitrate, (B) phosphate, and (C) silicate concentrations. (Means \pm SD). Water transfer from mesocosms to microcosms and WSF addition on day 3 (----->).



The silicate concentrations decreased steadily in the course of the experiment (Fig. 5C) and significant differences ($p < 0.05$) appeared from day 4 to the end of the experiment, with final concentrations much lower for NUVBR ($2.39 \pm 0.03 \mu\text{mol l}^{-1}$) and HUVBR ($3.46 \pm 1.33 \mu\text{mol l}^{-1}$) treatments than for NUVBR+WSF ($11.33 \pm 0.05 \mu\text{mol l}^{-1}$) and HUVBR+WSF ($9.87 \pm 0.84 \mu\text{mol l}^{-1}$) treatments, with significant results of MANOVA for Day \times WSF effects ($p < 0.001$).

Biological parameters

Chlorophyll a concentrations - The concentration of Chl *a* was used as the main indicator of the total autotrophic biomass in the experiment. Chl *a* concentrations increased from day 1 ($0.58 \pm 0.05 \mu\text{g l}^{-1}$) to the end of the experiment (Fig. 6). Concentrations reached final values of $54.7 \pm 10.9 \mu\text{g l}^{-1}$ and $48.0 \pm 3.3 \mu\text{g l}^{-1}$ in the NUVBR and HUVBR, respectively, without Day \times UVBR effects ($p > 0.05$). Chl *a* concentration was significantly lower ($p < 0.01$) when WSF was present under both UVBR conditions (NUVBR+WSF: $8.1 \pm 3.5 \mu\text{g l}^{-1}$; HUVBR+WSF: $12.6 \pm 2.6 \mu\text{g l}^{-1}$) (Day WSF \times effects; $p < 0.01$). No significant differences were observed between NUVBR and HUVBR treatments.

Dynamic of the phytoplanktonic assemblage - Total abundance of phytoplankton $<20 \mu\text{m}$ in the mesocosms varied slightly (c.a. $1\text{-}3 \times 1000 \text{ cells ml}^{-1}$) in the first three days, with no

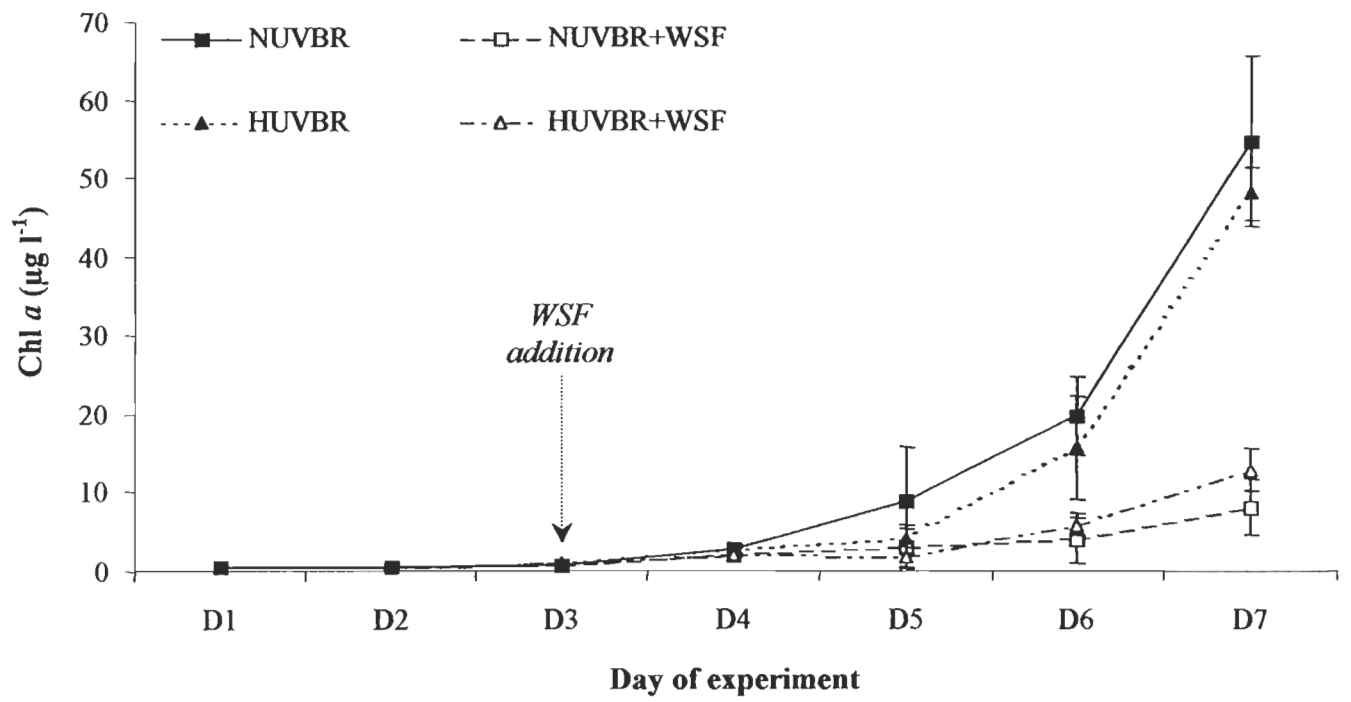
significant differences between NUVBR and HUVBR treatments (Fig 7). However, after transferring the samples to the microcosms and the WSF addition on day 3, MANOVA showed Day \times WSF and Day \times UVBR significant effects ($p < 0.001$) on the total abundance of phytoplankton $<20 \mu\text{m}$, but no significant interaction between both stresses with time was observed. A negative and significant effect ($p < 0.05$) on the total abundance of phytoplankton $<20 \mu\text{m}$ was then observed from day 4 (15h) to the end of the experiment for all treatments relative to NUVBR treatment. On the last day, total abundance of phytoplankton $<20 \mu\text{m}$, relative to NUVBR without WSF, was 60%, 79% and 84% lower in HUVBR, NUVBR+WSF, and HUVBR+WSF treatments, respectively.

In the absence of dissolved hydrocarbons and during the last days of the experiment, the higher total abundance of phytoplankton $<20 \mu\text{m}$ in the NUVBR treatments (final values: $31\,846 \pm 312 \text{ cells ml}^{-1}$) relative to HUVBR treatments (final values: $12\,852 \pm 1\,797 \text{ cells ml}^{-1}$) underlines a deleterious impact of UVBR on the smallest fraction of the assemblage ($<20 \mu\text{m}$). Indeed, total Chl *a* concentrations versus total abundance of cells $<20 \mu\text{m}$ highlight that large diatoms ($>20 \mu\text{m}$) were not affected by enhanced UVBR level. Addition dissolved hydrocarbons with HUVBR lowered total abundance of phytoplankton $<20 \mu\text{m}$ to $5\,124 \pm 1\,316 \text{ cells ml}^{-1}$ (HUVBR+WSF) whereas addition of dissolved hydrocarbons under NUVBR resulted in a final total abundance of $6\,625 \pm 2\,508 \text{ cells ml}^{-1}$ (NUVBR+WSF). However, no significant difference was observed between both treatments during the experiment.

Figure 6. Temporal changes of total chlorophyll *a* concentrations. (Means \pm SD).

Water transfer from mesocosms to microcosms and WSF addition on day 3

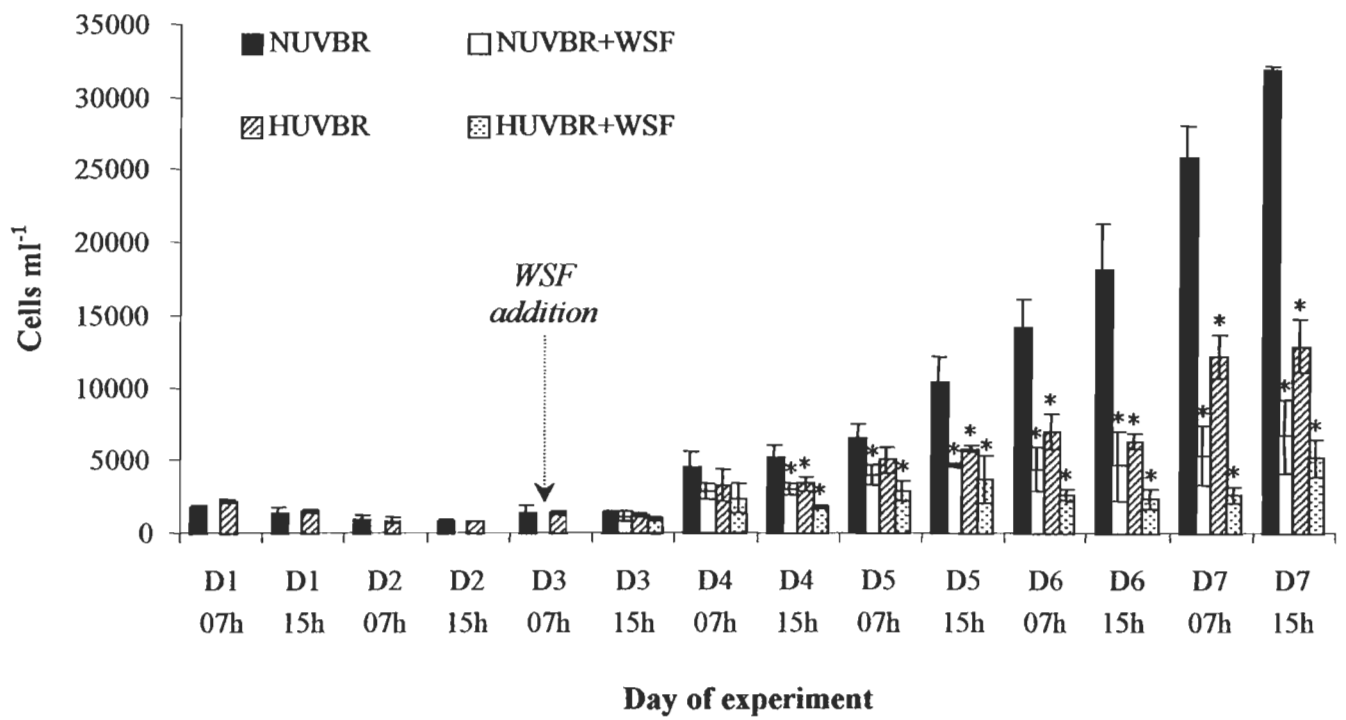
(\dashrightarrow).



Cell size changes - Forward scatter (FSC) signal in the cytometric analysis is generally used as an indicator of the particle size (Mostajir et al. 1999b). According to cellular characteristics measured with flow cytometry, two dominant groups have been distinguished among the phytoplankton <20 μm : small (1-3 μm) picoautotroph and large (3-10 μm) nanoautotroph cells (Fig. 8). Picoautotrophs in the NUVBR treatments showed lower size relative to those of HUVBR treatments, from days 4 to 6 (Fig. 8A). These differences were also significant on day 6 pm, when WSF is present. For nanoautotrophs, HUVBR+WSF exhibited significant highest values toward the end of the experiment, whereas NUVBR without WSF represented the lowest one (Fig. 8B). MANOVA showed only a Day \times WSF effects ($p < 0.05$) on these cellular characteristics.

In summary, cell size variations showed that under the HUVBR treatment, cells were larger than those exposed to NUVBR, and cells subjected to HUVBR+WSF were also larger than those in NUVBR+WSF treatment, and particularly for nanoautotrophs, but significant differences were only observed between NUVBR and HUVBR+WSF treatments.

Figure 7. Temporal changes in total abundance of phytoplankton cells < 20 μm , as determined by flow cytometry. (Means \pm SD). *Significant differences ($p < 0.05$) between treatments and relative to NUVBR. Water transfer from mesocosms to microcosms and WSF addition on day 3 (----->).



Growth rate – Based on the exponential increase in their abundance observed under natural irradiance conditions (NUVBR treatment; from day 4 and day 7) (Fig. 7), growth rates ranged between 0.22 ± 0.03 and 0.28 ± 0.02 d^{-1} for nanoautotrophs and picoautotrophs, respectively, when no additional stress was considered other than the natural sunlight exposition (Table 4). A general pattern emerged with higher growth rates in NUVBR (0.26 ± 0.03 d^{-1}) followed by HUVBR (0.18 ± 0.05 d^{-1}), NUVBR+WSF (0.11 ± 0.02 d^{-1}), and finally HUVBR+WSF (0.10 ± 0.04 d^{-1}) where the lowest values were recorded. Both WSF-added treatments presented significant lower values than those observed under NUVBR treatment for all fractions considered.

Moreover, nanoautotroph assemblage exhibited a greater inhibition than picoautotroph assemblage for all treatments, and relative to NUVBR. Inhibition values were higher for HUVBR+WSF treatment with values up to 95% against 81% inhibition in NUVBR+WSF, relative to natural conditions (NUVBR treatment), but no significant difference was observed between these two WSF-added treatments.

Figure 8. Temporal changes of forward scatter (FSC, cell size) for (A) 1-3 μm , and (B) 3-10 μm fractions. (Means \pm SD). *Significant differences ($p < 0.05$) between HUVBR+WSF and all other treatments. Water transfer from mesocosms to microcosms and WSF addition on day 3 (----->).

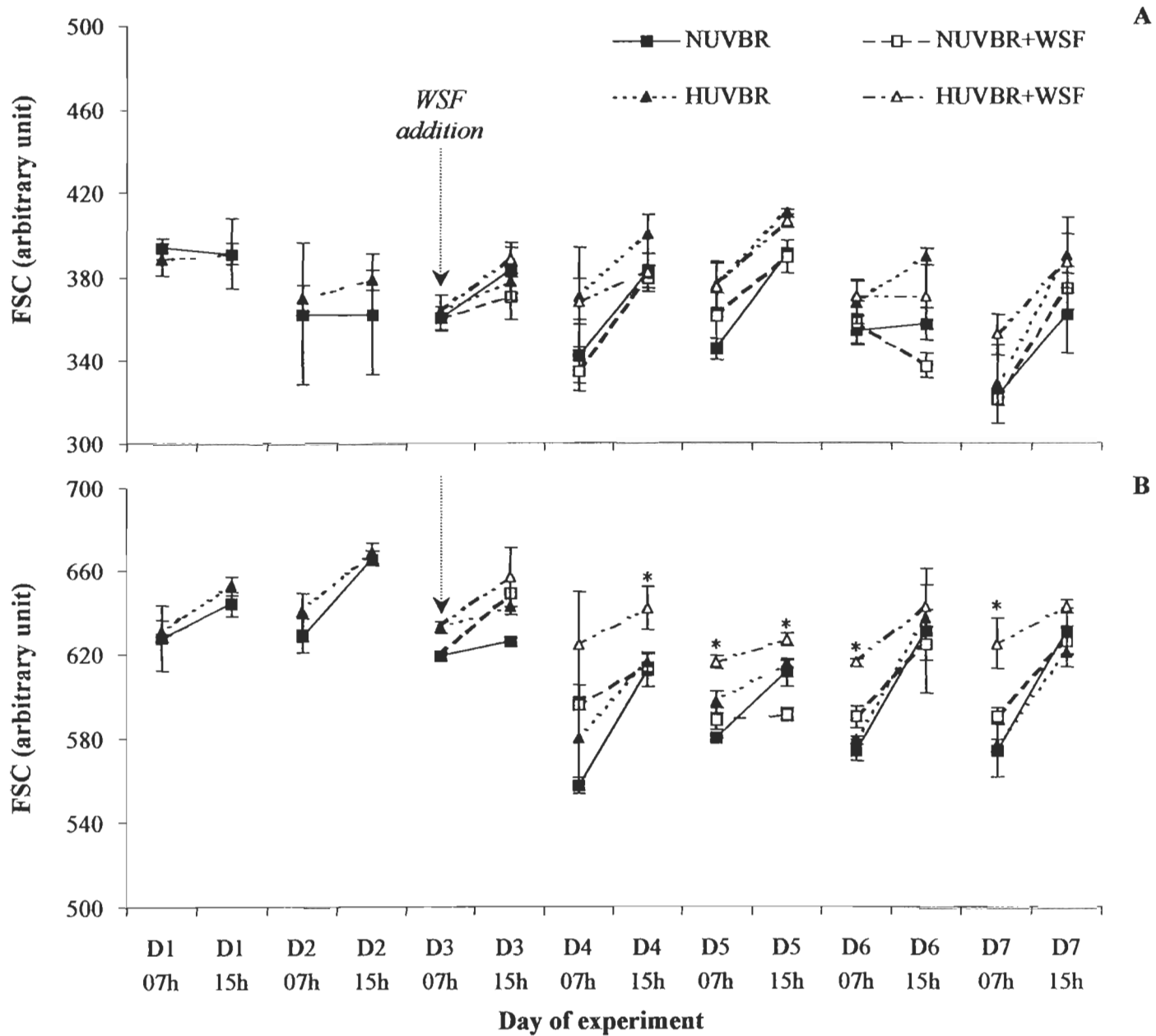


Table 4. Growth rates (k , d^{-1}) calculated during the exponential phase for all phytoplankton assemblages. Inhibition of growth rate was also calculated as the % decrease from growth rate observed in NUVBR treatment for each phytoplankton assemblage. (Means \pm SD). *Significant differences ($p < 0.05$) between treatments and relative to NUVBR.

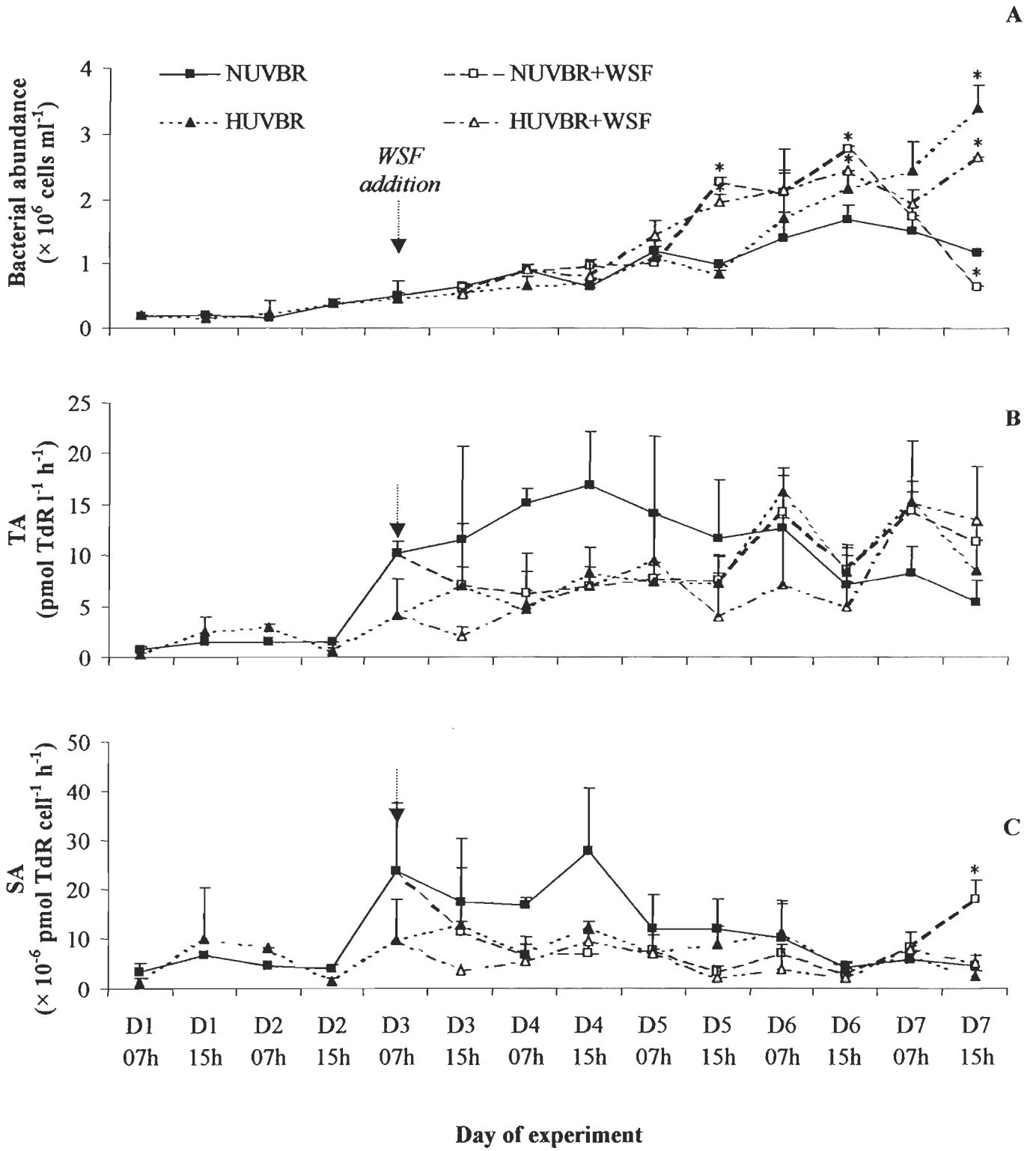
	NUVBR	NUVBR+WSF	HUVBR	HUVBR+WSF
Total cells <20 μm	0.26 \pm 0.03	0.11 \pm 0.02* (-57%)	0.18 \pm 0.05 (-30%)	0.10 \pm 0.04* (-60%)
1-3 μm cells (Picoautotroph assemblage)	0.28 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02* (-38%)	0.25 \pm 0.03 (-13%)	0.15 \pm 0.04* (-47%)
3-10 μm cells (Nanoautotroph assemblage)	0.22 \pm 0.06	0.04 \pm 0.01* (-81%)	0.15 \pm 0.06 (-35%)	0.01 \pm 0.03* (-95%)

Bacterial abundance and incorporation of $^3\text{H-TdR}$ - Bacterial abundance in the four treatments at the beginning of the experiment was $< 0.2 \times 10^6$ cells ml^{-1} . Then, bacteria increased up to day 6 pm in all treatments (Fig. 9A). Furthermore, for days 5 and day 6, NUVBR+WSF and HUVBR+WSF treatments showed significant higher ($p < 0.05$) bacterial abundance (2.76×10^6 and 2.47×10^6 cells ml^{-1} , respectively) than NUVBR and HUVBR without WSF (1.7×10^6 and 2.17×10^6 cells ml^{-1} , respectively). On day 7, bacterial abundance increased in both HUVBR treatments whereas it decreased to 1.15×10^6 and 0.63×10^6 cells ml^{-1} in NUVBR and NUVBR+WSF, respectively. Differences are significant ($p < 0.05$) between all treatments at the end of the experiment, and relative to NUVBR treatment. MANOVA detected significant Day \times WSF and Day \times UVBR effects ($p < 0.01$), but without Day \times WSF \times UVBR effects.

At the beginning of the experiment, the average bacterial rate of TdR incorporation for all treatments (no significant difference) was 0.5 ± 0.2 pmol TdR $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$ (total activity; TA).

The day of WSF addition (day 3) a significant difference ($p < 0.05$) was already observed between NUVBR (10 pmol TdR $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$) and HUVBR (4 pmol TdR $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$) treatments, following the two previous days of UVBR exposure (Fig. 9B). MANOVA showed a Day \times WSF effects and Day \times UVBR effects ($p < 0.01$). No interaction between both stresses with time was recorded.

Figure 9. Temporal changes in (A) bacterial abundance as determined by DAPI-fluorescence counts, (B) total bacterial activity (TA), and (C) specific bacterial activity (SA), as determined by thymidine incorporation. (Means \pm SD). *Significant differences ($p < 0.05$) between treatments and relative to NUVBR. Water transfer from mesocosms to microcosms and WSF addition on day 3 (----->).



Thereafter, TA increased rapidly in NUVBR without WSF from day 3 am (10.14 ± 1.22 pmol TdR $l^{-1} h^{-1}$) to day 4 pm (16.90 ± 5.23 pmol TdR $l^{-1} h^{-1}$), remained relatively stable until day 6 and, then decreased again the last 48h to reach a final value of 5.43 ± 2.11 pmol TdR $l^{-1} h^{-1}$ (Fig. 9B). TA did not show any pattern for the other treatments until day 5 pm where a periodic pattern emerged with higher values on the morning, and lower ones in the middle of the afternoon.

The lowest thymidine incorporation rate observed was ca. 40%, 33%, and 30% of the NUVBR treatment on day 4 am, for NUVBR+WSF, HUVBR+WSF, and HUVBR alone, respectively. Thereafter and to the end of the experiment, thymidine incorporation rate increased continuously for these three treatments. Final values of TA were 148%, 108%, and 58% higher than NUVBR treatment for HUVBR+WSF, NUVBR+WSF and HUVBR treatments, respectively.

Cellular rates of TdR incorporation (specific activity: SA) are shown in Fig. 9C. As for TA, SA values were higher for NUVBR from day 3 to day 5 than for HUVBR, NUVBR+WSF and HUVBR+WSF. A periodical pattern was observed for these last three treatments from day 5, with SA values higher on the morning and lower in the middle of the afternoon. By the end of the experiment, SA values in NUVBR+WSF, HUVBR+WSF, NUVBR, and HUVBR, were 1.8×10^{-5} , 5.09×10^{-6} , 4.70×10^{-6} , and 2.58×10^{-6} pmol TdR $Cell^{-1} h^{-1}$, respectively, representing a ca 54% SA inhibition by UVBR increase in the

HUVBR treatment, relative to NUVBR. Similarly, a ca 72% SA inhibition was recorded for HUVBR+ WSF relative to NUVBR+ WSF.

DISCUSSION

Combined effects of ultraviolet light and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been previously demonstrated in laboratory experiments with individual well-characterized aquatic species and some specific PAHs at concentrations largely higher than those occurring in surface waters (Huang et al. 1993, Marwood et al. 1999, Diamond et al. 2000). Moreover, the use of a single PAH with one species (or even a group of species) is arguably poorly representative of field conditions that comprise numerous PAHs and PAH-degradation products and ecological assemblages of species. To date, there have been no in situ studies that clearly and directly assessed ecological effects of co-exposure to UVBR and PAHs on natural populations (McDonald & Chapman 2002). In the present investigation, the microcosm approach provided a useful outdoor exposure system in which a natural planktonic assemblage was exposed to sunlight and artificial enhanced UVBR simulating ozone depletion and to a realistic amount of dissolved hydrocarbons in the water column as often observed after an oil spill (Boehm & Fiest 1982).

In the absence of enhanced UVBR level, added dissolved hydrocarbons resulted in negative and significant effects on the natural planktonic assemblage. On the other hand, UVBR also induced negative effects but in a lesser extent and the combination of dissolved PAHs and UVBR resulted in no significant additive nor synergistic effects. This study provides therefore the first evidence of a non-synergistic interaction between both stresses,

and suggests that under strong deleterious effects of soluble petroleum hydrocarbons, the UVBR-induced effects on marine microorganisms can be completely masked.

Relevance of UVBR exposure levels

The fluorescent light tubes provided a significant increase in the most damaging short UVB wavelengths. Indeed, the enhanced UVBR treatments were adjusted to represent UVBR levels likely to occur under 60% ozone depletion conditions at the specific site, according to the model of Diaz et al. (2000). This value represents the maximum reported UVBR increase measured during an ozone hole event on sites such as Patagonia in Southern Argentina (Kirchhoff et al. 1997). The relative weighted enhancement in this study (2.15) was greater than the relative enhancement (1.24) associated with the ozone hole over Antarctica (Cullen et al. 1992). However, increased irradiance was attenuated throughout the water column of the microcosms, and at half-depth of the microcosms, the planktonic cells were submitted to only 15% of the surface enhanced UVBR level whereas receiving 82% of the surface PAR. Such light attenuation in the water column of the mesocosms was representative of the natural ecosystem where Kuhn et al. (1999) reported K_d values ranging between 0.7 to 4.5 m^{-1} with corresponding depth penetration between 6.6 and 1 m. For PAR, K_d value was 0.57 m^{-1} , i.e. 8.92 m depth of 1% light. In the St. Lawrence Estuary, this value ranged from 0.29 to 0.53 m^{-1} (1% surface PAR at 8.6-16.0 m) in July (Levasseur et al. 1984).

Relevance of WSF toxicity

Most known toxic constituents of petroleum are relatively water soluble. Consequently, particular attention was paid to its water extractable fraction, and our results are consistent with previously reported data for different WSF crude oils (Saeed et al. 1998, Saeed & Al-Mutairi 2000). Naphthalene is always present and levels of monomethyl-naphthalenes (two isomers) are always higher than the level of naphthalene itself. Moreover these PAHs are responsible for most of the toxic effects in marine organisms (Sæthre et al. 1984). On the other hand, the potential for photoinduced toxicity of PAHs has been related to their molecular structure (Mekenyan et al. 1994), and naphthalene and analogs may exhibit relatively larger than expected phototoxicity if they are bioaccumulated in larger amounts than other more phototoxic products (Ren et al. 1994). Moreover, the higher UVBR doses applied under HUVBR treatments would tend to enhance the phototoxicity of these compounds (Mekenyan et al. 1994). The WSF used in our experiment is therefore expected to cause phytotoxicity and photoinduced toxicity on natural assemblages.

After addition of WSF to the microcosms, naphthalene and analogs were no more detected in the water samples during the experiment, because of their very low concentrations near to the detection limit of the analytic method used (Table 3). However, Siron et al. (1996) reported that a WSF concentration lower than 0.8 mg l^{-1} inhibited growth rate, confirming the high phytotoxicity of WSF crude oil in which naphthalene and analogs are the major toxic components, even at low concentrations. It is possible that these

compounds have been readily taken up by cells resulting in a rapid decrease of water concentrations below the detection limit of the technique. Wolfe et al. (1998) also observed an initial rapid association of naphthalene with a maximum algal uptake occurring within the first hour of exposure.

The hypothesis of a relative enrichment in smaller and fluorescent PAHs compounds shown by synchronous spectra under HUVBR+WSF treatment (Fig 4c and 4d) was however not supported by identification of PAH metabolites by GC/MS. This could be due to the very low concentrations of these compounds. Moreover, our analytical method only targets the most nonpolar compounds present, whereas phototoxic manifestation induced by naphthalene and analogs (major components of the WSF used in the present investigation) may involve the rapid conversion of these compounds to the corresponding more polar oxidation products including naphthols, ketones, and quinones (Bagchi et al. 1998). But these newly fluorescent materials formed during the course of the experiment may not be derived from the WSF used, but from fluorophores, located between 260 and 280 nm emission wavelengths, often predominant in marine waters (De Souza Sierra et al. 1994). This increase in new fluorophores could be due to either the release of dissolved proteins (Coble et al. 1990) from cell lysis of stressed phytoplankton as shown by the reduced survival for larger phytoplankton cells, or through UVBR photolysis of the high molecular weight dissolved organic matter into smaller molecular weight photoproducts (Lindell et al. 1995).

Therefore, on one hand, negative effects observed on the planktonic assemblage under both WSF-added treatments have been attributed to identified compounds present in the WSF, as they are known to be phytotoxic. On the other hand, the absence of significant and more deleterious effects under HUVBR+WSF treatment compared with the NUVBR+WSF one suggested that the formation of PAHs photoproducts was probably not occurring in the present study or no more detectable, primarily due to the overlapping contributions from biological degradation products from cell lysis and/or DOM photodegradation.

Mechanisms and relevance of WSF addition upon the planktonic assemblage

The high initial concentrations of nutrients favoured the development of large cells (>20 μ m) in WSF-free treatments during the experiment, whereas lower total Chl *a* concentrations in WSF-added treatments imply a direct impact of dissolved hydrocarbons without UVBR effects on the same phytoplankton fraction. Relative to hydrocarbon compounds, the high susceptibility of diatoms has been attributed to the fact that silica is a good absorbent and that the frustules of the diatoms absorb and retain these compounds (Siron et al. 1996). Moreover, being relatively hydrophobic, dissolved PAHs accumulate in the photosynthetic membrane where they could interfere with Chl *a* synthesis (Duxbury et al. 1997). More specifically, it was demonstrated that the toxic manifestations induced by naphthalene (i.e. the main compound in the present WSF used) may involve the conversion

of this compound to the corresponding naphthoquinones as well as hydroxylated products including naphthols (Bagchi et al. 1998). Such degradation products can potentially block photosynthesis, especially where plastoquinone is used as an electron acceptor or donor (Huang et al. 1997), because of their structural similarity with the Q_b -binding niche in PS II.

Therefore and following bioaccumulation, dissolved hydrocarbons could interfere with photosynthesis either through direct toxic effects and indirect photosensitization reactions involving reactive oxygen species (ROS). Although major hydrocarbon compounds in our WSF (i.e. naphthalene and analogs) are not considered to be genotoxic, they can induce the production of ROS which may enhanced lipid peroxidation and cause DNA damages (Bagchi et al. 1998), following their photosensibilization after bioaccumulation (Marwood et al. 1999, Choi & Oris 2000). The highly reactive quinone derivatives may also be responsible for the hydrocarbons-induced oxidative stress and toxic manifestation, as they are know to bind covalently to biological membranes (Sikkema et al. 1995). Whether hydrocarbons-derived quinones produce ROS or whether hydrocarbons such naphthalene and its metabolites react directly with macromolecules remains to be determined. However, such toxic manifestations resulted in the increase in cell size and reduction in growth rates as observed under both WSF-added treatments. The perturbation of the cell cycle and decrease in growth rates acted together to result on ~80% mortality of phytoplankton <20 μ m observed in WSF-added treatments relative to that found in NUVBR treatment.

Following WSF addition under both NUVBR and HUVBR light treatments, deleterious effects of dissolved hydrocarbons were also observed on the bacterial assemblage with lower total (TA) and specific (SA) bacterial activities until days 5. Indeed, major WSF compounds (i.e. naphthalene and derivatives) have been shown to induce a longer lag phase in bacterial growth (Garcia et al. 1998). By the end of the experiment, increase in bacterial activity was observed relative to NUVBR treatment, suggesting an increase in carbon supply. Such additional carbon source could come from dissolved hydrocarbons themselves (Nigam et al. 1996) as well as from the release of DOM from WSF-stressed phytoplankton cells. Such increase in bacterial growth substrates could have resulted in an acclimation of the bacterial assemblage to the elevated toxicity of the medium as suggested by Garcia et al. (1998), as well as in an adaptation throughout changes in species composition. However, WSF addition also resulted in increasing bacterial abundance followed by a decrease by the end of the experiment. This decrease could be ascribed to grazing by heterotrophic flagellates. Indeed, dissolved hydrocarbons as additional carbon supply supported the increase of bacteria which in turn probably accelerated the growth of bacterial grazers (Yamada et al. 2003).

Mechanisms and relevance of enhanced UVBR upon the planktonic assemblage

The absence of significant difference in Chl *a* concentrations between NUVBR and HUVBR treatments observed in the present study was previously reported (Mousseau et al.

2000, Wångberg et al. 2001), and attributed to the fact that diatoms were more resistant to UVR exposure as compared to other phytoplanktonic groups (Karentz et al. 1991, Helbling et al. 1996). However, significant differences were observed between both UVBR treatments when considering the total abundance of cells $<20 \mu\text{m}$. Such vulnerability of smallest phytoplankton fractions has already been reported by Belzile et al. (1998) who demonstrated no UVBR effects on total Chl *a* concentrations, but subtle UVBR effects on specific groups of organisms (5-20 μm cells). Results would therefore reflect subtle direct UVBR stress imposed on this smaller phytoplanktonic fraction, as large herbivores were excluded from the present study and no significant differences were observed between nutrient status with no depleted-nutrient conditions until the last day of the experiment.

The cellular mechanisms underlying the observed decrease in abundance of phytoplankton cell $<20 \mu\text{m}$ could range from ultraviolet induced DNA damage and subsequent cell cycle perturbations such as increasing cell size and reduction in growth rate (Karentz et al. 1991, Buma et al. 1996, 2001), to inactivation of photosystem II reaction centers (Marwood et al. 2000). HUVBR treatment presented lower growth rates values, as well as higher cell size, but the absence of significance suggested that UVBR was not enough to induce ultimately such physiological perturbations. It is likely that repair processes, protection and/or tolerance strategies may also play a significant role, as well as shifts from UVBR-sensitive species towards more UVBR-tolerant species without necessarily change total biomass (i.e. Chl *a* concentrations).

Although it was demonstrated that UVBR effects were subtle and only on the smallest fraction of the phytoplankton assemblage, it seems that it was sufficient to induce a positive feedback on bacterial abundance. This seemingly positive effect resulted in an increasing bacterial abundance likely due to the release of DOM from UVBR-stressed phytoplankton cells (Malinsky-Rushansky & Legrand 1996). Under UVBR stress, bacteria could also be favoured due to an UVBR-induced decrease in bacterivory (Chatila et al. 2001). However, the lower bacterial activities under HUVBR treatment relative to NUVBR treatment (Fig. 9) showed also direct negative effects of UVBR. Indeed, UVBR has been previously demonstrated to induce DNA damages with the formation of thymine dimers (Jeffrey et al. 1996). These cellular damages were correlated with a significant reduction in bacterial activities (Aas et al. 1996, Boelen et al. 2002). Therefore, the overall response of the bacterial assemblage to the present UVBR stress was the net result between direct negative effects during the first days of the experiment and positive feedback of deleterious effects of UVBR on other trophic levels by the end of the experiment.

Relevance of combined effects of WSF and enhanced UVBR

In the present study, it was demonstrated that (i) a realistic amount of dissolved hydrocarbons simulating an oil spill event induced important deleterious effects on a natural planktonic assemblage, and (ii) an increase in UVBR levels resulted in subtle damages and more specifically on the smallest phytoplankton fraction (i.e. <20 μm).

Moreover, the bacterioplankton response seemed to be additionally regulated by the effects of UVBR on the predation pressure. Bacterial grazers could be more sensitive to enhanced UVBR than to WSF, resulting in a positive feedback on bacterial abundance under both HUVBR treatments. It could have been therefore expected that the co-occurrence of both stresses will exacerbate each of these individual effects. However, no significant differences between both WSF-added treatments under the two different UVBR conditions, as well as no significant interaction between WSF and UVBR were observed. Our results indicate that the deleterious effects of dissolved hydrocarbons on the natural planktonic assemblage exceeded the potential deleterious effects of UVBR, resulting in no measurable effect (i.e. additive or synergistic effects) due to the co-occurrence of both stresses. This study provides therefore that the co-exposure of dissolved hydrocarbons and enhanced UVBR contrasts with additive or antagonistic interactions which may also exist between UVBR and other environmental factors.

As previously pointed out, the concentrations of dissolved hydrocarbons used in this study were representative of an oil spill event. It should be noted that synergistic or additive effects probably could take place at lower concentrations (i.e. chronic inputs of hydrocarbons into aquatic systems) representative of more typical situations in coastal areas. However, with the experimental approach used here we cannot support the latter speculation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant and by the Fonds FCAR of Québec to S.D. and E.P.. It is a contribution to an international research program of Inter American Institut for Global Change Research (IAI). We would like to acknowledge Drs S. Diaz, S. Roy and B. Klein for providing radiation data, and K. Lacoste for its assistance in the experimental. This study is a contribution to the Institut des Science de la Mer de Rimouski (ISMER) and Québec-Océan network.

REFERENCES

- Aas P, Lyons MM, Pledger R, Mitchell DL, Jeffrey WH (1996) Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquat Microb Ecol* 11: 229-238
- API (American Petroleum Institute) (1986) The role of Chemical Dispersants in Oil Spill Control. Washington, DC: American Petroleum Institute.
- Bagchi M, Bagchi D, Balmoori J, Ye X, Stohs SJ (1998) Naphthalene-induced oxidative stress and DNA damage in cultured macrophage J774A.1 cells. *Free Rad Biol Med* 25: 137-143
- Behrenfeld MJ, Lee II H, Small LF (1994) Interactions between nutritional status and long-term responses to ultraviolet-B radiation stress in a marine diatom. *Mar Biol* 118: 523-530
- Belzile C, Demers S, Lean DRS, Mostajir B, Roy S, de Mora S, Bird D, Gosselin M, Chanut J-P, Levasseur M (1998) An experimental tool to study the effects of ultraviolet radiation on planktonic communities: a mesocosm approach. *Environ Technol* 19: 667-682
- Bergmann T, Richardson TL, Paerl HW, Pinckney J-L, Schofield O (2002) Synergy of light and nutrients on the photosynthetic efficiency of phytoplankton populations from the Neuse River Estuary, North Carolina. *J Plankton Res* 24: 923-933

- Boehm PD, Fiest DL (1982) Subsurface distributions of petroleum from an offshore well blowout. The Ixtoc I Blowout, Bay of Campeche. *Environ Sci Technol* 16: 67-74
- Boelen P, Post AF, Veldhuis MJW, Buma AGJ (2002) Diel patterns of UVBR-induced DNA damage in picoplankton size fractions from the Gulf of Aqaba, Red Sea. *Microb Ecol* 44: 164-174
- Buma AGJ, Engelen AH, Gieskes WWC (1997) Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. *Mar Ecol Prog Ser* 153: 91-97
- Buma AGJ, Van Hannen EJ, Roza L, Veldhuis MJW, Gieskes WWC (1996) Monitoring ultraviolet-B induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimer detection. *J Phycol* 31 : 314-321
- Buma AGJ, Helbling EW, Karin de Boer M, Villafañe VE (2001) Patterns of DNA damage and photoinhibition in temperate South-Atlantic picophytoplankton exposed to solar ultraviolet radiation. *J Photochem Photobiol* 62: 9-18
- Chatila K, Demers S, Mostajir B, Gosselin M, Chanut J-P, Monfort P, Bird D (2001) The responses of a natural bacterioplankton community to different levels of ultraviolet-B radiation: a food web perspective. *Microb Ecol* 41: 56-68
- Choi J, Oris JT (2000) Evidence of oxidative stress in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) liver microsomes simultaneously exposed to solar ultraviolet radiation and anthracene. *Environ Toxicol Chem* 19: 1795-1799
- Coble PG, Green SA, Blough NV, Gagosian RB (1990) Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature* 348: 432-434

- Cullen JJ, Neale PJ (1997) Biological weighting functions for describing the effects of ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. In: Häder DP (ed) Effects of ozone depletion on aquatic ecosystems. RG Landes, Georgetown: 97-118
- Cullen JJ, Neale PJ, Lesser MP (1992) Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. *Science* 258: 646-650
- De Souza Sierra MM, Donard OFX, Lamotte M, Belin C, Ewald M (1994) Fluorescence spectroscopy of coastal and marine waters. *Mar Chem* 47: 127-144
- Diamond SA, Mount DR, Burkhard LP, Ankley GT, Makynen EA, Leonard EN (2000) Effect of irradiance spectra on the photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem* 19: 1389-1396
- Diaz S, Deferrari G, Martinioni D, Oberto A (2000) Regression analysis of biologically effective integrated irradiances versus ozone, clouds and geometric factors. *J Atm Solar terrest* 62: 629-638
- Duxbury CL, Dixon DG, Greenberg BM (1997) Effects of simulated solar radiation on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the duckweed *Lemna gibba*. *Environ Toxicol Chem* 16: 1739-1748
- Fauchot J, Gosselin M, Levasseur M, Mostajir B, Belzile C, Demers S, Roy S, Villegas PZ (2000) Influence of UV-B radiation on nitrogen utilization by a natural assemblage of phytoplankton. *J Phycol* 36: 484-496
- Fuhrman JA, Azam F (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar Biol* 66: 109-120

- Garcia EM, Siegert IG, Suarez P (1998) Toxicity assays and naphthalene utilization by natural bacteria selected in marine environments. *Bull Environ Contam Toxicol* 61: 0370-0377
- Helbling EW, Villafañe VE, Ferrario M, Hom-Hansen O (1992) Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar Ecol Prog Ser* 80: 89-100
- Helbling EW, Chalker BE, Dunlap WC, Holm-Hansen O, Villafane VE (1996) Photoacclimation of Antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *J Exp Mar Bio Ecol* 204:85-101
- Huang XD, Dixon DG, Greenberg BM (1993) Impacts of ultraviolet radiation and photomodification on the toxicity of PAHs to the higher plant *Lemna gibba* L. G-3 (duckweed). *Environ Toxicol Chem* 12: 1067-1077
- Huang X-D, Krylov SN, Ren L, McConkey BJ, Dixon DG, Greenberg BM (1997) Mechanistic quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: II. An empirical model for the toxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Environ Toxicol Chem* 16: 2296-2303
- Jeffrey WHM, Ledger RJ, Aas P, Hager S, Coffin RB, Von Haven R, Mitchell DL (1996) Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Mar Ecol Prog Ser* 137: 283-291
- Karentz D, Cleaver JE, Mitchell DL (1991) Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J Phycol* 27: 326-341

- Kirchhoff VWJH, Zamorano F, Casiccia C (1997) UV-B enhancements at Punta Arenas, Chile. *J Photochem Photobiol B: Biol* 38: 174-177
- Kuhn P, Browman H, McArthur B, St-Pierre J-F (1999) Penetration of ultraviolet radiation in the waters of the estuary and Gulf of St. Lawrence. *Limnol Oceanogr* 44: 710-7169
- Levasseur M, Therriault J-C, Legendre L (1984) Hierarchical control of phytoplankton succession by physical factors. *Mar Ecol Prog Ser* 19: 211-222
- Liess M, Champeau O, Riddle M, Schulz R, Duquesne S (2001) Combined effects of ultraviolet-B radiation and food storage on the sensitivity of the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* to copper. *Environ Toxicol Chem* 20: 2088-2092
- Lindell MJ, Granéli W, Tranvik LJ (1995) Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 40: 195-199
- Longhi ML (2003) L'influence de l'état nutritionnel du phytoplancton sur la réponse au rayonnement UV-B à différentes latitudes. Ms. Thesis, Université du Québec à Rimouski: 74p
- Malinsky-Rushansky NZ, Legrand C (1996) Excretion of dissolved organic carbon by phytoplankton of different sizes and subsequent bacterial uptake. *Mar Ecol Prog Ser* 132: 249-255
- Mallakin A, McConkey BJ, Miao G, McKibben B, Snieckus V, Dixon DG, Greenberg BM (1998) Impacts of structural photomodification on the toxicity of environmental contaminants: anthracene photooxidation products. *Ecotoxicol Environ Saf* 43: 204-212

- Marwood CA, Smith REH, Solomon KR, Charlton MN, Greenberg BM (1999) Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assemblages of lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation. *Ecotoxicol Environ Saf* 44: 322-327
- Marwood CA, Smith REH, Furgal JA, Charlton MN, Solomon KR, Greenberg BM (2000) Photoinhibition of natural phytoplankton assemblages in lake Erie exposed to solar ultraviolet radiation. *Can J Fish Aquat Sci* 57: 371-379
- McConkey BJ, Duxbury CL, Dixon DG, Greenberg BM (1997) Toxicity of PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: effects of phenanthrene and its primary photoproduct, phenanthrenequinone. *Environ Toxicol Chem* 16: 892-899
- McDonald BG, Chapman PM (2002) PAH phototoxicity-an ecologically irrelevant phenomenon ? *Mar Pollut Bull* 44: 1321-1326
- Mekenyan OG, Ankley GT, Veith GD, Call DJ (1994) QSAR estimates of excited states and photoinduced acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Res* 2: 237-247
- Mostajir B, Sime-Ngando T, Demers S, Belzile C, Roy S, Gosselin M, Chanut J-P, De Mora S, Fauchot J, Vidussi F, Levasseur M (1999a) Ecological implications of changes in cell size and photosynthetic capacity of marine *Prymnesiophyceae* induced by ultraviolet-B radiation. *Mar Ecol Prog Ser* 187: 89-100

- Mostajir B, Demers S, de Mora S, Belzile C, Chanut J-P, Gosselin M, Roy S, Villegas PZ, Fauchot J, Bouchard J (1999b) Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation in a planktonic community. *Limnol Oceanogr* 44: 586-596
- Mousseau L, Gosselin M, Levasseur M, Demers S, Fauchot J, Roy S, Villegas PZ, Mostajir B (2000) Effects of ultraviolet-B radiation on simultaneous carbon and nitrogen transport rates by estuarine phytoplankton during a week-long mesocosm study. *Mar Ecol Prog Ser* 199: 69-81
- Müller-Niklas G, Heissenberger A, Puškaric S, Herndl GJ (1995) Ultraviolet-B radiation and bacterial metabolism in coastal waters. *Aquat Microb Ecol* 9: 111-116
- Neale PJ, Cullen JJ, Davis RF (1998) Inhibition of marine photosynthesis by ultraviolet radiation: variable sensitivity of phytoplankton in the Weddell-Scotia Confluence during the austral spring. *Limnol Oceanogr* 43: 433-448
- Neale PJ, Lesser MP, Cullen JJ (1994) Effects of ultraviolet radiation on the photosynthesis of phytoplankton in the vicinity of McMurdo station, Antarctica. In: Weiler CS, Penhale PA (Eds) *Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects*. *Antartic Res Ser* 62. American Geophysical Union, Washington, DC: 125-142
- Nigam P, banat IM, Marchant R, Singh D (1998) Degradation of naphthalene by bacterial cultures. *Environ Int* 24: 671:677
- OBS (Ocean Studies Board) (2003) *Oil in the sea III: Inputs, fates, and effects*. Committee on oil in the sea: inputs, fates, and effects, National Research Council: 280p
- Parsons TR, Maita Y, Lalli LM (1984) *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press. Toronto

- Ren L, Huang XD, McConkey BJ, Dixon DG, Greenberg BM (1994) Photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons (fluoranthene, pyrene and naphthalene) to the Duckweed *Lemna gibba* L.G-3. *Ecotoxicol Environ Saf* 28: 160-171
- Sæthre LJ, Falk-Petersen I-B, Sydnes LK, Lønning S, Naley AM (1984) Toxicity and chemical reactivity of naphthalene and methylnaphthalenes. *Aquat Toxicol* 5: 291-306
- Saeed T, Al-Mutairi M, Ali LN, Al-Obaid T, Beg MU (1998) The effect of temperature on the composition and relative toxicity of the water-soluble fraction of Kuwait crude oil (export) in the seawater. *Int J Environ Anal Chem* 72: 275-287
- Saeed T, Al-Mutairi M (2000) Comparative composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sea water-soluble fractions of different Kuwaiti crude oils. *Adv Environ Res* 4: 141-145
- Scheiner SM, Gurevitch J (1993) Design and analysis of ecological experiments. Chapman and Hall: 445p
- Schindell DT, Rind D, Lonergan P (1998) Increase polar stratospheric ozone losses and delayed eventual recovery owing to increasing greenhouse-gas concentrations. *Nature* 392: 589-592
- Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbial Rev* 59: 201-222
- Siron R, Giusti G (1990) Hydrocarbon pollution in particle-rich waters (Gulf of Fos-sur-Mer): comparative study of extraction procedures. *Mar Chem* 30: 379-388
- Siron R, Pelletier É, Roy S (1996) Effects of dispersed and adsorbed crude oil on microalgal and bacterial communities of cold seawater. *Ecotoxicol* 5: 229-251

- Smith DC, Azam F (1992) A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using ^3H -Leucine. *Mar Microb Food Webs* 6: 107-114
- Vincent WF, Roy S (1993) Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection and recovery. *Environ Res* 1: 1-12
- Wakeham SG (1977) Synchronous fluorescence spectroscopy and its application to indigenous and petroleum-derived hydrocarbons in lacustrine sediments. *Environ Sci Technol* 11: 272-276
- Wängberg S-Å, Wulff A, Nilsson C, Stågel U (2001) Impact of UV-B radiation on microalgae and bacteria: a mesocosm study with computer modulated UV-B radiation addition. *Aquat Microb Ecol* 25: 75-86
- Wolfe MF, Schwartz GJB, Singaram S, Mielbrecht EE, Tjeerdema RS, Sowby ML (1998) Influence of dispersants on the bioavailability of naphthalene from the water-accommodated fraction crude oil to the Golden-Brown alga, *Isochrysis galbana*. *Arch Environ Contam Toxicol* 35: 274-280
- Yamada M, Takada H, Toyoda K, Yoshida A, Shibata A, Nomura H, Wada M, Nishimura M, Okamoto K, Ohwada K (2003) Study on the fate of petroleum-derived polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the effect of chemical dispersant using an enclosed ecosystem, mesocosm. *Mar Pollut Bull* 47: 105-113

CHAPITRE 2

**CASE STUDY OF MULTIPLES STRESSORS ON A
NATURAL PLANKTONIC ASSEMBLAGE:
WATER SOLUBLE CRUDE OIL AND ENHANCED UVBR
LEVEL AT USHUAIA (ARGENTINA)**

Sargian P, Mas S, Pelletier É, Demers S.

RÉSUMÉ

Les concentrations en pigments phytoplanctoniques, la fluorescence *in vivo*, ainsi que l'abondance et les caractéristiques cellulaires du phyto (FSC et SSC)- et bactérioplancton (SSC et FL1) ont été mesurées sur un assemblage planctonique naturel prélevé dans la baie d'Ushuaia (54.8°S; 68.2°W, Tierra del Fuego, Argentina), en réponse à différents traitements expérimentaux, à savoir : RUVB naturel et artificiellement accru (respectivement NUVBR et HUVBR traitements) et addition de la fraction soluble (WSF) d'un pétrole brut sous ces deux conditions de lumière (respectivement NUVBR+WSF et HUVBR+WSF traitements). Ainsi, après 5 jours d'expérience, des effets dus au RUVB accru ont été observés, avec une diminution journalière du rendement photochimique suivi d'un rétablissement au cours de la nuit, ainsi qu'une augmentation de la teneur en pigments photoprotecteurs. Cependant, en raison de leur petite taille, les cellules picophytoplanctoniques semblent avoir subi plus de photo-dommages, comme le démontre l'augmentation de leur taille cellulaire moyenne et la diminution de leur taux de croissance, impliquant une perturbation du cycle cellulaire. D'autre part, la différence de réponse entre les bactéries HNA (haute teneur en acide nucléique) et LNA (faible teneur en acide nucléique) a permis d'observer une plus grande vulnérabilité de la part des bactéries LNA au stress UVB. L'addition de la WSF a également induit des effets similaires sur l'assemblage phytoplanctonique, mais par contre les bactéries ont été positivement affectées, et plus particulièrement les bactéries LNA et les colonies bactériennes formant des unités (CFU). La combinaison des deux stressés n'a fait qu'exacerber ces effets

individuels, démontrant ainsi des effets synergiques entre le RUVB et la WSF. De plus, un développement de l'espèce *Cryptomonas* sp. n'a été observé que dans le traitement soumis aux deux stressés, probablement en réponse à sa capacité d'alternance entre phototrophie et mixotrophie suite à des conditions limitantes défavorables.

Mots-clés: Rayonnement ultraviolet-B•fraction soluble pétrolière•bactéries et phytoplancton marins•effets synergiques•*Cryptomonas* sp.

ABSTRACT

Changes in phytoplanktonic pigment content, *in vivo* fluorescence as well as abundance and cellular characteristics of phyto-(FSC and SSC) and bacterioplankton (SSC and FL1) were investigated on a natural planktonic assemblage from marine waters of Ushuaia Bay (Southern Argentina) in response to different experimental treatments: natural and enhanced UVBR exposures (NUVBR and HUVBR treatments, respectively), and water soluble fraction (WSF) of crude oil contamination under both UVBR treatments (NUVBR+WSF and HUVBR+WSF treatments, respectively). After 5-day exposure to experimental treatments in microcosms, significant UVBR-induced deleterious effects were observed, with afternoon depression of the photochemical yield followed by night-time recovery. A significant increase in photoprotective pigments was also observed. Due to their smaller size, picophytoplankton cells appeared to be more impacted than nanophytoplankton cells as revealed by their increasing mean cell size and decreasing growth rate implying the perturbation of the cell cycle. On the other hand, the differential response between HNA (high nucleic acid content) and LNA bacteria (low nucleic acid content) suggests a higher vulnerability of LNA bacteria to UVBR stress. WSF was also shown to induce deleterious effects on phytoplankton assemblage. Nevertheless, bacteria were positively affected, and particularly LNA bacteria as well as colony-forming unit (CFU). The combination of WSF and enhanced UVBR exposure resulted in an exacerbation of these individual effects, demonstrating a synergistic effect between both stresses. Moreover, *Cryptomonas* sp. were observed to develop only under dual stresses, in

response to their capacity to switch between phototrophic and mixotrophic states following stressed conditions.

Keywords: ultraviolet-B radiation•water soluble crude oil•marine bacteria and phytoplankton•synergistic effects•Cryptomonas sp.

INTRODUCTION

Aquatic communities are complex entities regulated by a variety of physicochemical and biological processes. Among natural environmental factors, sunlight is an important variable that influences the development and diversity of aquatic photosynthetic organisms. However, since the discovery of the ozone hole over Antarctica (Molina & Rowland 1974), it is now well established that sunlight experiences an unbalance in its spectral irradiance, i.e. an increase in ultraviolet-B radiation (UVBR: 280-320 nm) reaching Earth's surface. Therefore, a significant number of papers on detrimental effects of UVBR on living organisms was produced in the last two decades, focusing from cellular DNA damages (Buma et al. 1996, Vincent & Neale 2000) to shift in species composition and ecosystem function (Mostajir et al. 2000). Indeed, such damages are closely linked to shorter and more energetic wavelengths whereas repair processes and photosynthesis require longer wavelengths (Ultraviolet-A radiation; UVAR: 320-400 nm, and photosynthetically available radiation; PAR: 400-700 nm) (Cullen et al. 1992).

In addition to these increased UVBR levels, aquatic organisms experience a variety of man-induced stressors, such as toxic chemicals directly released in aquatic systems. Therefore, responses of organisms to environmental conditions will result from direct and indirect individual stressor's impacts, or a combination of several man-induced perturbations. Indeed, UVBR may also be an interactive variable which can compromise both the ability of an organism to cope with a chemical (photoinduced sensitivity) (Preston

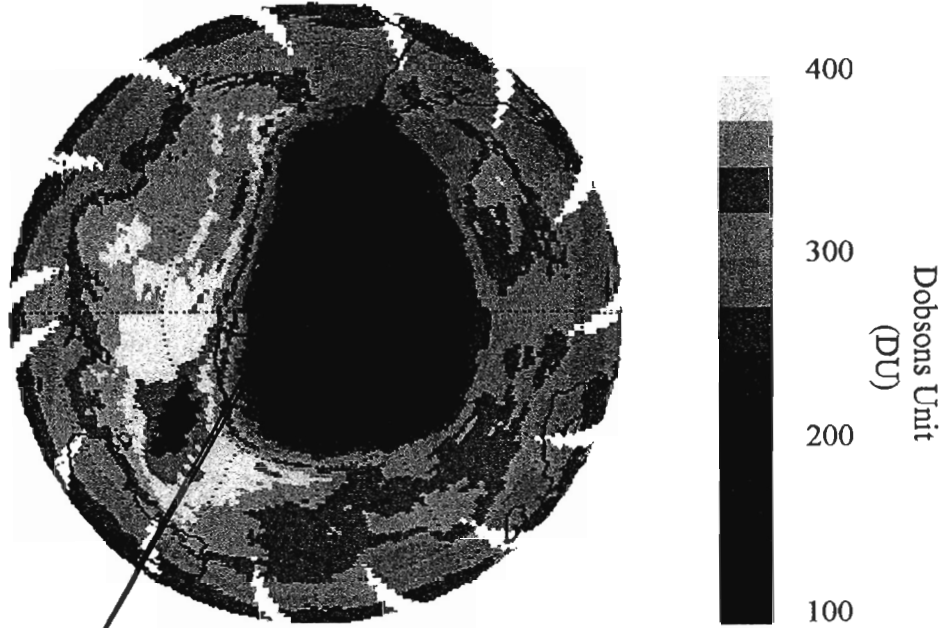
et al. 1999, Liess et al. 2001, Duquesne & Liess 2003) and promote the increase of the chemical toxicity (i.e. photoinduced toxicity) (Arfsten et al. 1996). In this way, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a prevalent group of organic contaminants known to exhibit a photoinduced toxicity (Arfsten et al. 1996). This photoinduced toxicity is now well demonstrated in laboratory studies (Huang et al. 1993, Ankley et al. 1994, 1995, Nikkilä et al. 1999). However, all of them were conducted with specific PAHs on laboratory cultured organisms. Up to now, only few field studies have been conducted (Marwood et al. 1999, Diamond et al. 2003), and McDonald & Chapman (2002) advanced that the question about the ecological relevance of PAH phototoxicity remains actually unanswered. Moreover, it was previously demonstrated in a microcosm approach that UVBR-induced deleterious effects on marine organisms can be masked by a realistic environmental concentration of dissolved hydrocarbons with a non-synergistic interaction between both stresses (Sargian et al. in press). This study was performed in northern latitudes (Canada; 48.6°N, 68.2°W) where climatic models predict an extent of the Arctic ozone hole comparable to the one already observed over Antarctica (Austin et al. 1992, Rex et al. 2004).

At high latitude southern hemisphere, ground-level UVR has increased over the past two decades in response to the springtime Antarctic ozone loss, as far north as Ushuaia, Argentina at latitude 54.59°S (Frederick et al. 1993, Frederick et al. 1994). It is therefore interesting to assess if such combined effects of dissolved hydrocarbons and enhanced UVBR could be different according to the ecosystem considered, and particularly because

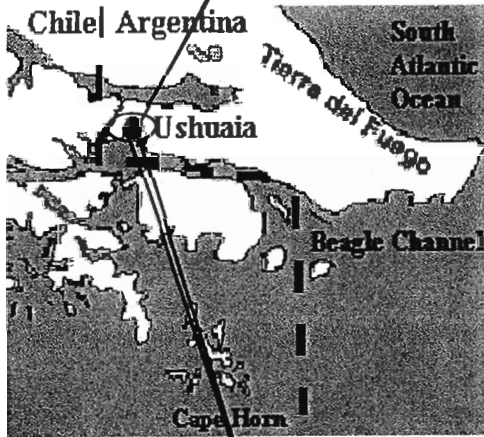
phytoplanktonic cells are more or less UVBR-sensitive, depending on their light environment (Helbling et al. 1992). In this context, combined effects were also assessed in Ushuaia (Tierra del Fuego, Argentina) as it represents the southern tip of South America, experiencing more pronounced ozone reduction than any other inhabiting location in the world (Fig. 1A). For this purpose, we repeated in Ushuaia Bay the experimental design previously used for study in Canada (Sargian et al. in press). A natural planktonic assemblage $<150 \mu\text{m}$ was therefore collected in the bay and investigated during a 5-day period in microcosms. Specifically, dissolved hydrocarbons were added under both natural and enhanced UVBR levels, and responses of both bacterioplankton and phytoplankton assemblages were determined. UVBR-induced effects alone were also assessed, as well as natural experimental conditions (i.e. without pollutant under ambient UVBR levels).

Figure 1. Schematic view of (A) the localization of the area under the Antarctic ozone hole on Oct. 15, 2001 (from the NASA Total Ozone Mapping Spectrometer (TOMS) web site: <http://jwocky.gsfc.nasa.gov/>), (B) the localization of the experimental site on the southern tip of South America, (C) the random position of the mesocosms at the wharf structure, and (D) the experimental design of the microcosms. C: microcosms without hydrocarbons; H: microcosms with hydrocarbons.

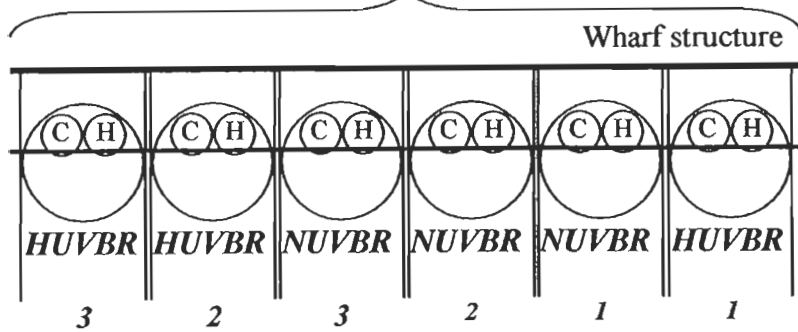
A



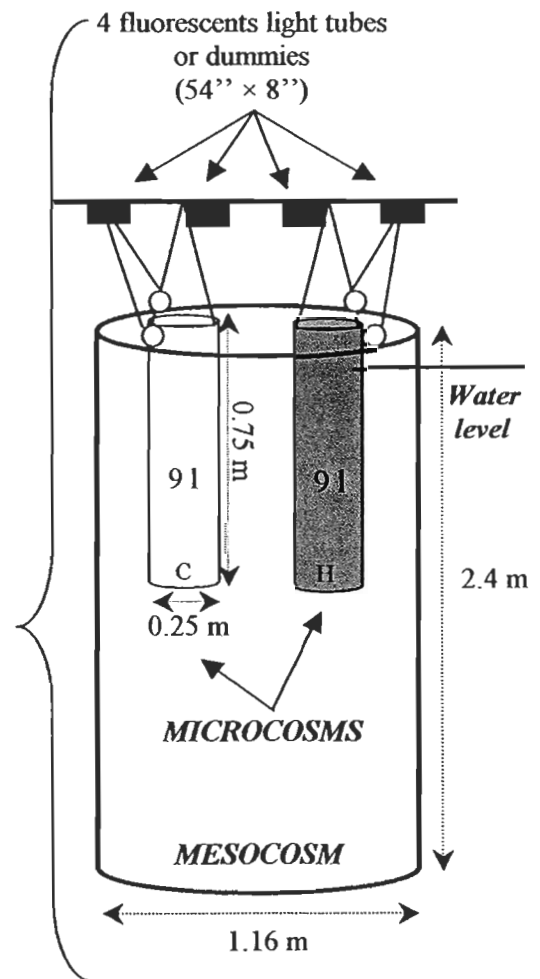
B



C



D



MATERIALS AND METHODS

Experimental set-up

The experiment was performed from 6th to 10th of November 2001 in the Bahia Ushuaia, near the Ushuaia city (54.8°S; 68.2°W, Tierra del Fuego, Argentina) (Fig. 1B). Natural water was pumped from 2 m depth using a submersible electropump (Ebara Italia S.p.A., model BEST 3M), and then delivered simultaneously to large mesocosms (clear polyethylene bags: 2.4 m deep and a volume of ~1900 L each) attached in a random order to a wharf structure (Fig. 1C). For our specific objectives, 9 L-microcosms (cylindrical Teflon® bags, resistant to UV degradation) were immersed in mesocosms, filled with filtered seawater through a 150-µm net to exclude large grazers, and submitted to two light conditions, each in triplicate: (i) natural UVBR level (NUVBR treatment), and (ii) high UVBR level (HUVBR treatment). For the last treatment, the UVBR intensity was increased using four fluorescent light tubes (Philips TL40W-12RS), suspended 35 cm above the water surface. Wavelengths shorter than 280 nm emitted by tubes and not encountered in nature (UVCR) were screened out by cellulose diacetate film (Cadillac film) which was replaced daily.

In each mesocosm, two Teflon bags were immersed (Fig. 1D): one received the water soluble fraction (WSF) of a Patagonian crude oil, while the other one was kept free of

WSF. Thus, the following nomenclature used was: (i) NUVBR and HUVBR treatments for uncontaminated microcosms, under NUVBR and HUVBR light conditions, respectively, and (ii) NUVBR+WSF and HUVBR+WSF treatments for microcosms with WSF addition, under NUVBR and HUVBR light conditions, respectively.

Incident solar radiation & UV profiles

Incident solar radiation was collected with a SUV-500 installed on the roof of the Centro Austral de Investigaciones Cientificas (CADIC), which is located at 5 km from the experimental site. UV irradiance through the water column was measured at the center of the mesocosms with a PUV-500 profiling radiometer (Biospherical Instruments Inc.) at 11:00, 13:15 and 15:30 daily. The PUV-500 radiometer provided a measure of cosine-corrected downwelling irradiance at 305, 320, 340, and 380 nm and a downwelling, cosine-corrected of PAR (400-700 nm). The irradiance attenuation coefficient (K_d , m^{-1}) in the mesocosm was calculated from equation 1:

$$K_d = \log (I_{D_0}/I_D) / (D-D_0) \quad \text{Equation (1)}$$

Where I_{D_0} is irradiance measured at the underwater surface and D the irradiance measured at depth D .

WSF preparation, addition and chemical analysis

To prepare the WSF, 40 ml of a Patagonia crude oil was floated over 4 L of 0.45 μm filtered seawater into a carefully pre-cleaned glass jar. The jar was sealed and the mixture was stirred slowly for 60h at room temperature, without disturbing the oil/water interface. The stirring speed was adjusted so that the vortex did not extend more than 25% of the distance to the bottom of the jar. Thereafter, the WSF was removed by siphoning. 1 L of this WSF was then added in microcosms NUVBR+WSF and HUVBR+WSF to reach a final concentration of $\sim 5 \text{ mg l}^{-1}$.

For further analysis, 200 ml of samples were collected on days 1, 3 and 5. Both dissolved (i.e. passing through 0.7 μm Whatman GF/F filters) and particulate (i.e. retained on 0.7 μm Whatman GF/F filters) phases were immediately and separately extracted twice with dichloromethane (DCM). Total aromatic hydrocarbons were analyzed by measuring the fluorescence of the extracts with a Perkin-Elmer LS 50B luminescence spectrometer using the synchronous fluorescence excitation-emission method (Wakeham 1977).

The experiment was performed right after the local spring algal bloom, and water analysis done in the Ushuaia Bay prior to the experiment showed that nutrient levels were not high enough to sustain the experimental period. A 2 L solution containing 2 μmol of NO_3 and 3.33 μmol of SiO_3 was therefore added to each mesocosm during their filling.

Thereafter, 100 ml samples were collected each day (7:00 h) for determination of dissolved nitrate+nitrite, phosphate, and silicate concentrations. Samples were filtered through pre-combusted Whatman GF/F filters and stored at -80°C until analysis using a Technicon TAI Autoanalyzer according to Strickland & Parsons (1984).

Fluorescence induction analysis

The photosynthetic activity of phytoplankton was determined using PAM modulated chlorophyll fluorometer (Opti-sciences, Effeltrich, Germany). Twice a day (07:00 and 15:00 h), 20 ml of samples were incubated for 30 min in the dark. Then, modulated light was used to determine the minimum fluorescence obtained in the dark-adapted state (F_0). Maximum fluorescence (F_m) was determined for the dark-adapted state by applying a saturating pulse. Determination of F_0 and F_m allowed the evaluation of the variable fluorescence (F_v), and the maximum efficiency of the photosystem II (PS II), F_v/F_m as follow:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m \quad \text{Equation (2)}$$

This photochemical yield of open PS II reaction centers is used as an indicator of photoinhibition.

Pigments analysis

Daily samples (250 ml) were filtered onto Whatman GF/F filters and stored at –80°C before phytoplanktonic pigment analysis. Frozen filters were thereafter extracted with 3 ml 95% methanol. The extracts were sonicated and centrifuged, and then filtered through 25 mm diameter polypropylene syringe filters (MFS HP020, 0.2 µm pore size) to remove cells and filter debris. Each extract (200 µl) was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC system: AS3000 Autosampler, SCM1000 Solvent Degasser, SN4000 Interface Controller, Absorbance Detector, Fluorometer) according to the method of Zapata et al. (2000).

Major taxon-specific pigments were identified, normalized to the Chl *a* content and then expressed as pigment:Chl *a* ratios. Total photoprotective (PPCs) and total photosynthetic (PSCs) carotenoids were also determined and normalized to Chl *a* content.

Growth rates for major taxonomic groups were assessed from changes in the concentration of taxon-marker pigments using the following equation:

$$k_{pigment} = \ln (C_f - C_i) / (D_f - D_i) \quad \text{Equation (3)}$$

where C_f and C_i are pigment concentrations at final and initial time of the experiment, respectively.

Flow cytometry analysis

Flow cytometric measurements were used to determine cellular characteristics, including cell abundance, cellular fluorescence (red: FL3), side scattering (SSC; for internal and external structures), and forward angle light scattering (FSC; related to the particle size), during the 5-d experiment. These analyses were performed with a FACSort Analyser flow cytometer (FCM, Becton-Dickinson) fitted with a 488 nm laser. The FSC and fluorescence signal were calibrated just before analysis using Fluoresbrite beads (Polyscience, Inc.) of different sizes. Samples were collected at 07:00 and 15:00 h. Duplicates of 2 ml fresh samples were immediately analysed after adding beads of 2 and 10 μm as internal standards. The flow cytometer rate was set to 60 $\mu\text{l min}^{-1}$. The acquisition time was 10 min during the two first days of sampling and 5 min thereafter. Phytoplankton cells were detected using FL3 ($> 650 \text{ nm}$), which is attributed to Chl *a*. The data were logged using Cell Quest® and then analyzed with Attractor® softwares, both from Becton-Dickinson.

The apparent phytoplankton growth rate was calculated according to the following equation:

$$k = \ln (N_5 - N_1) / (D_5 - D_1) \quad \text{Equation (4)}$$

where N_5 and N_1 are cell numbers at final time D_5 and initial time D_1 of the exponential phase observed under NUVBR treatment, respectively.

Cytometry analyses were also used to determine bacterial abundance. Water samples (2 ml) were fixed with formaldehyde (2% final concentration) two times per day (7:00 and 15:00 h) in each microcosm and were frozen at -80°C prior to analyses. The samples were later stained with one μl of a SYBR Green-II solution (Molecular probes Inc.) for a minimum of 15 min in the dark. Bacterial cells were discriminated and enumerated according to their signature in a plot of side scatter (SSC, X-axis, and indicative of cellular size) versus green fluorescence (FL1, Y-axis, green fluorescence from SYBR-green related to nucleic acid content) (Lebaron et al. 1998). Following Servais et al. (2003), two bacterial groups were differentiated: low nucleic acid content (LNA bacteria) and high nucleic acid content (HNA bacteria). Each subgroup was delimited on the SSC versus green fluorescence plot and cell abundance was determined in each subgroup, as well as their cellular characteristics. Fluorescent beads ($1.009 \mu\text{m}$; Polysciences) were systematically added to each analyzed sample to normalize cell fluorescence emission and light scatter values. The acquisition time was 1 min during the two first days of sampling and 30 s thereafter. Data were once again logged using Cell Quest® and then analyzed with Attractor® softwares (Becton-Dickinson).

Heterotrophic bacterial counts

Viable counts of aerobic heterotrophic bacteria were made using the spread plate technique on Marine Agar 2216 (DIFCO). Triplicate plates for each sample were incubated ten days at room temperature ($\sim 20^{\circ}\text{C}$). Thereafter, typical colonies were counted and the number of bacteria was calculated from the volume of filtered water and expressed as colony forming units (CFU). Such heterotrophic counts are representative of a small group of active bacteria that react immediately to changes in nutrient supply; thus they are useful indicators of environmental changes (Delille et al. 1989).

Statistical analysis

As all measurements consisted in repeated samplings of the same water mass (i.e. individual microcosms), a multivariate analysis of variance (MANOVA) was applied to assess Time effects as well as Time \times UVBR, Time \times WSF, and Time \times UVBR \times WSF interactions on the different dependent variables described above. Thereafter, two-way ANOVA (WSF and UVBR factors) were performed by sampling day to detect treatment effects. When ANOVAs revealed a significant effects of treatment ($p < 0.05$), post-hoc multiple means comparisons were performed in order to identify which treatment gave significantly different measurements from the others. All statistical analyses were carried out using the SPSS for Windows 9.0 package (SPSS Inc.).

RESULTS

Light environmental conditions and UVBR levels

Maximal incident irradiances were $\sim 2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\sim 0.8 \text{ W m}^{-2}$, and $\sim 0.4 \text{ W m}^{-2}$ for PAR (400-700 nm), UVAR (340 nm), and UVBR (320 nm), respectively (data not shown). The last day of the experiment (Day 5), incident radiation was lower due to overcast, with maximal values of $\sim 1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\sim 0.5 \text{ W m}^{-2}$, and $\sim 0.24 \text{ W m}^{-2}$ for PAR, UVAR, and UVBR, respectively.

The mean daily irradiance just below the water surface in HUVBR mesocosms was 2.38-fold higher (at 320 nm) than that in the NUVBR mesocosms (Table 1). The mean K_d values were 1.73 (320 nm), 1.41 (340 nm) 0.77 (380 nm) and 0.56 m^{-1} (PAR), corresponding to depth of 1% light penetration of 2.73, 3.48, 6.26, and 8.34 m, respectively.

Chemical analysis

Dissolved hydrocarbons — Figure 2 presents the synchronous fluorescence spectra (SFS) of the Patagonian crude oil and the WSF obtained both in the dissolved and particulate phases. These spectra clearly show that both initial WSFs essentially consisted in light

polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (i.e. mono- and di-aromatics such as naphthalene and methylnaphthalenes) with a main compound at ~330 nm.

Figure 3 shows also temporal changes in SFS both in dissolved and particulate phases under both UVBR treatments. No significant differences were observed during the 5 d experiment between NUVBR and HUVBR treatments, for both phases. Only a decreasing fluorescence intensity with time could be noted, probably corresponding to a reduction in total hydrocarbon concentrations, and particularly for the dissolved phase.

Nutrients — Following nutrient addition before the experiment start, initial concentrations demonstrated equal distribution with no significant differences among mesocosms. Initial concentrations of nitrate+nitrite, phosphate and silicate were therefore $4.13 (\pm 0.41)$, $0.71 (\pm 0.04)$, and $3.79 (\pm 0.74) \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively. Thereafter, and throughout the experiment, no significant differences were observed for all nutrients, without nutrient exhaustion at the end of the experiment (data not shown).

Table 1. Daily irradiance just below the water surface (I_0 , $\mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ for PAR, and $\text{kJ m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{d}^{-1}$ for UV irradiance), vertical attenuation coefficient (K_d , m^{-1}) and mean depth of 1% light penetration ($Z_{1\%}$, m), measured in NUVBR and HUVBR mesocosms.

Mesocosm	I_0				K_d				$Z_{1\%}$			
	320 nm	340 nm	380 nm	PAR	320 nm	340 nm	380 nm	PAR	320 nm	340 nm	380 nm	PAR
NUVBR	4.88	9.56	10.66	0.02	1.58	1.37	0.8	0.55	3.01	3.36	6.19	8.47
(Sd)	(0.74)	(0.42)	(1.44)	(0.00)	(0.07)	(0.07)	(0.03)	(0.05)	(0.14)	(0.19)	(0.26)	(0.74)
HUVBR	11.66	9.4	7.77	0.02	1.88	1.45	0.73	0.56	2.45	3.59	6.33	8.21
(Sd)	(1.13)	(0.54)	(0.20)	(0.00)	(0.09)	(0.12)	(0.04)	(0.03)	(0.12)	(0.21)	(0.33)	(0.41)

Figure 2. Synchronous fluorescence spectra of Patagonia crude oil as well as spectra of dissolved and particulate phases of the initial WSF crude oil. Assignment of major peaks from Wakeham's data (1977). Scans excitation-emission wavelengths: 250-500 nm.

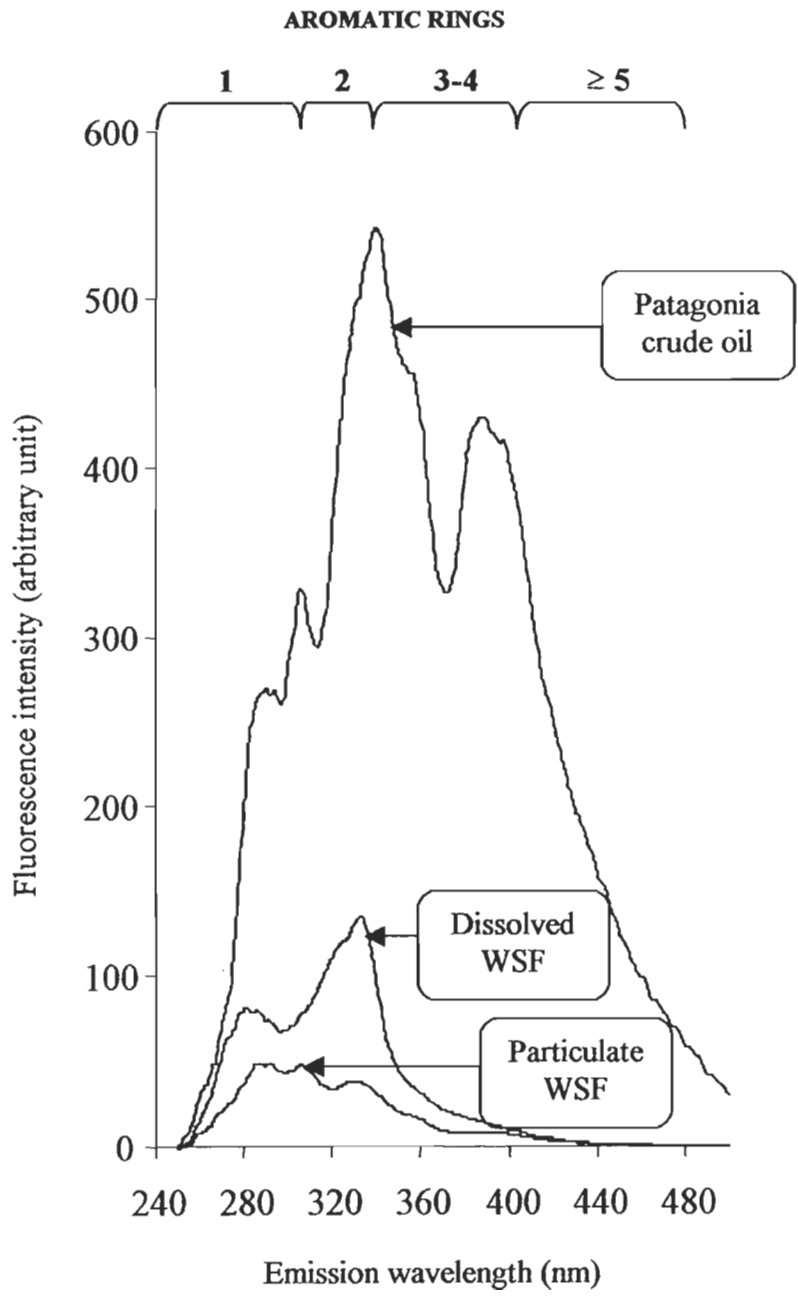
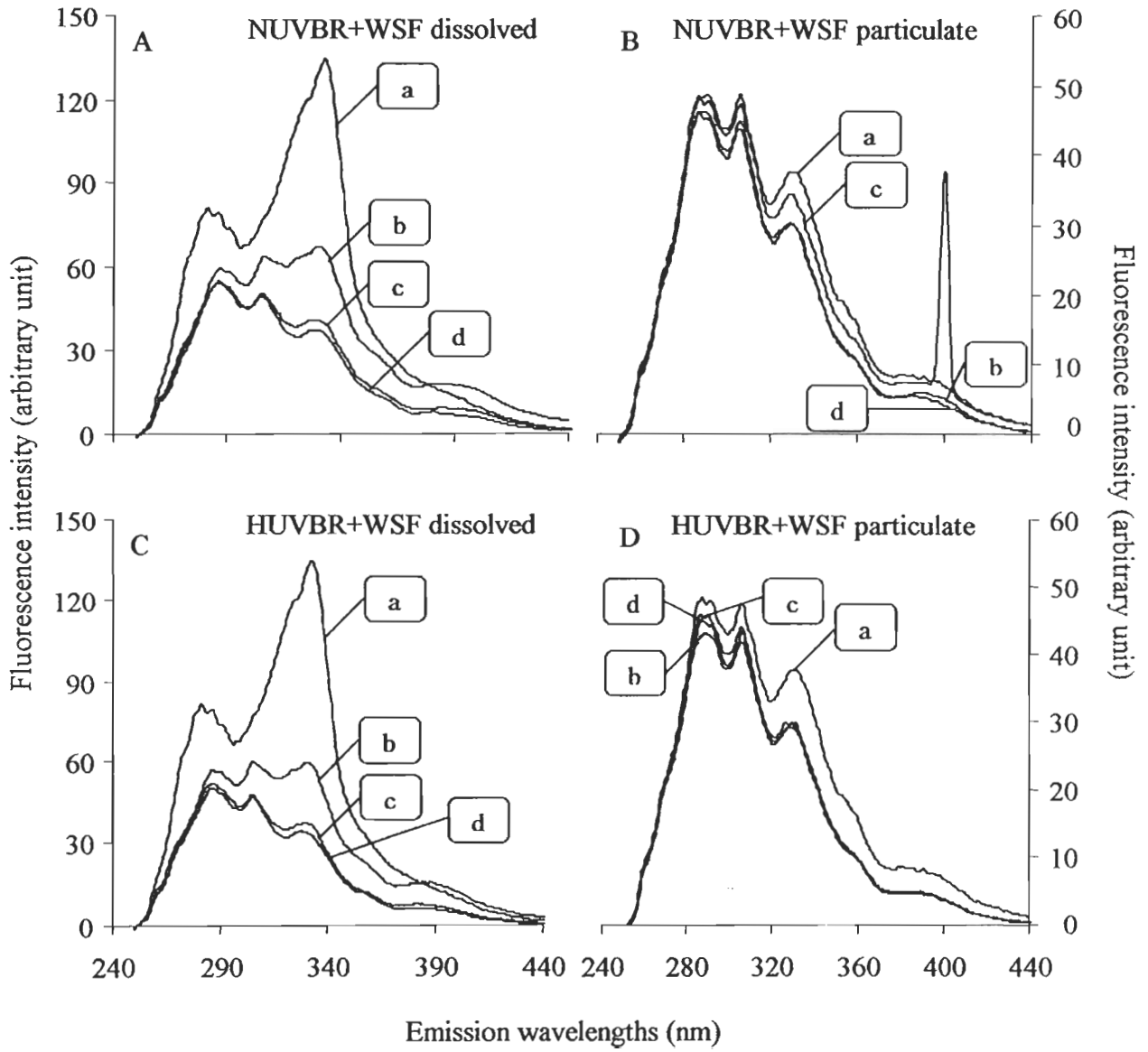


Figure 3. Synchronous fluorescence spectra of dissolved (A) and particulate (B) hydrocarbons in NUVBR+WSF, and synchronous fluorescence spectra of dissolved (C) and particulate (D) hydrocarbons in HUVBR+WSF. a: initial WSF, b: day 1, c: day 3, and d: day 5. Scans excitation-emission wavelengths: 250-500 nm.



Fluorescence induction

Fig 4. shows temporal changes of photochemical yield throughout the 5-day experiment. During the two first days, photochemical yield exhibited no significant differences between treatments. Values decreased from 0.57 (± 0.04 ; day 1pm) to 0.45 (± 0.03 ; day 2 pm). On day 3 and until the end of the experiment, all treatments presented a diel periodicity in F_v/F_m values, with significant decrease during the day and recovery at night. These differences were higher under both enhanced UVBR treatments (without and with WSF added), presenting significantly lower values ($p < 0.005$) in the afternoon (i.e. 55% inhibition on day 3 pm and 38% inhibition on day 4 pm). However, a complete recovery was observed at night, reaching similar values to UVBR-free treatments.

At the end of the experiment, HUVBR treatment presented significant lower values ($\sim -18\%$) than the NUVBR treatment, whereas the NUVBR+WSF treatment was significantly higher than the NUVBR treatment ($\sim +15\%$). No other significant differences were observed between NUVBR and HUVBR+WSF treatments. MANOVA results (Table 2) showed significant Time effects, as well as significant Time \times UVBR effects ($p < 0.001$).

Pigment analysis

Average Chl a concentration in all treatments at the beginning of the experiment was $2.68 \pm 0.16 \mu\text{g l}^{-1}$ (Fig. 5). Thereafter, Chl a concentrations increased continuously from day 3 to day 5 in NUVBR treatment, reaching a final value of $6.25 \pm 1.55 \mu\text{g l}^{-1}$. WSF addition resulted in a significant ($p < 0.05$) reduction in final Chl a of 58%, and enhanced UVBR exposure resulted in a significant ($p < 0.01$) lower final value of 76%, both relative to NUVBR treatment. The co-exposure to both stresses (HUVBR+WSF treatment) increased these individual effects with a final Chl a value of only $0.16 \pm 0.05 \mu\text{g l}^{-1}$ (i.e. lowering of 97% relative to NUVBR treatment). Moreover, MANOVA results demonstrated a significant interaction of both stresses with time ($p < 0.05$) (Table 2).

Figure 4. Temporal changes in photochemical yield ($F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$) as measured by PAM fluorometer during the experiment. ^aSignificant differences relative to NUVBR, ^{a,b}significant differences relative to NUVBR+WSF, and ⁺significant differences relative to HUVBR. (Means + SD).

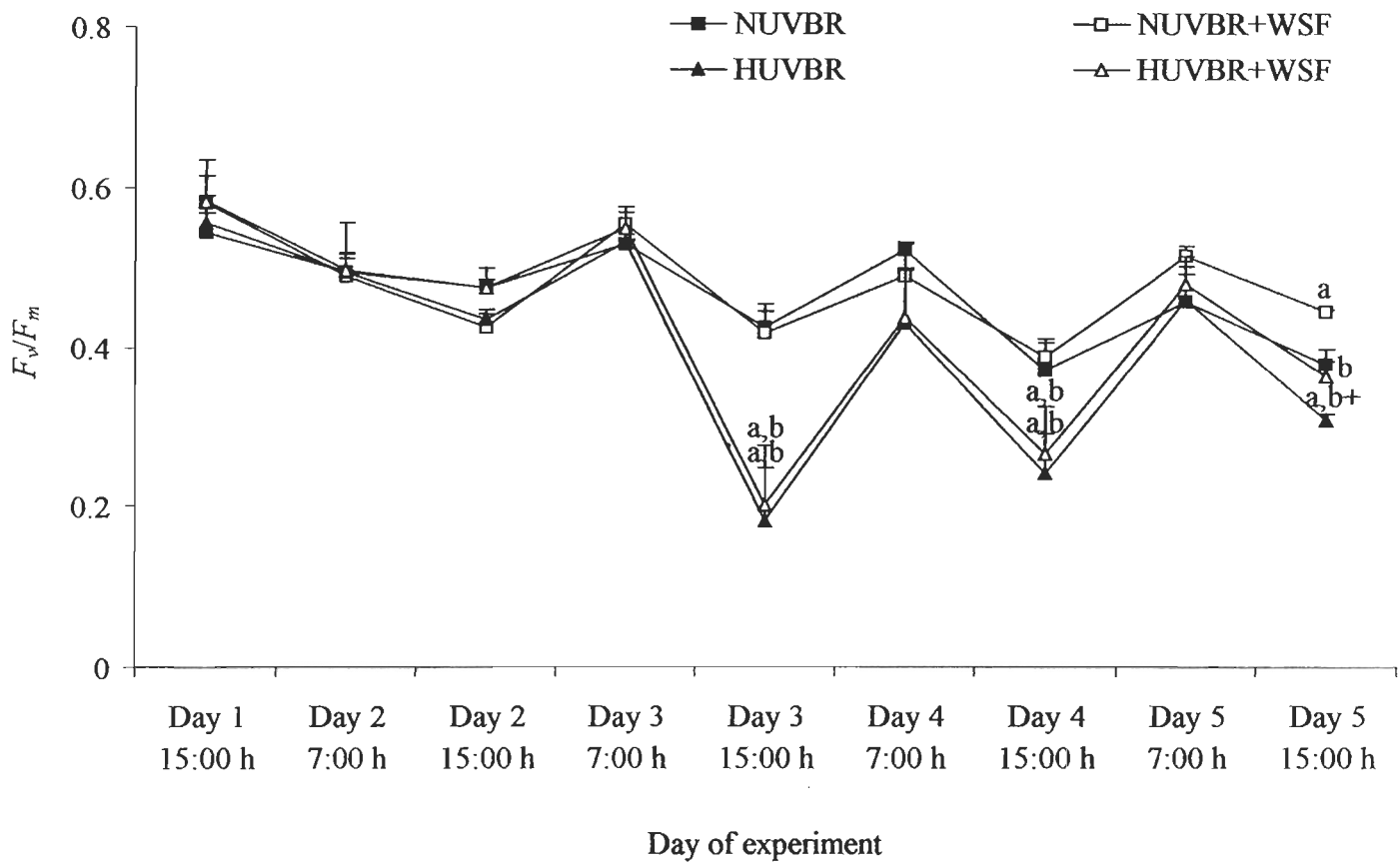
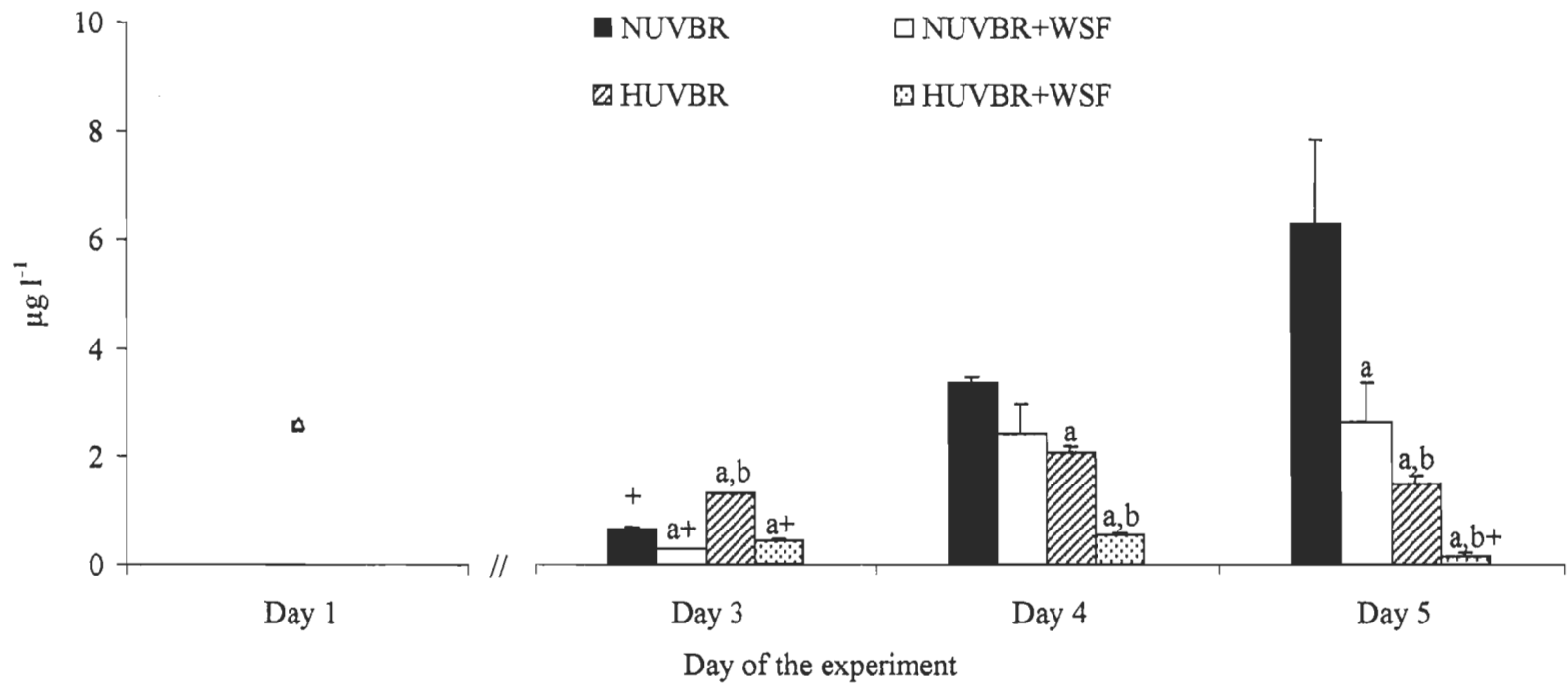


Table 2. Summary results of MANOVA for major parameters measured during the experiment, showing main effects of the repeated measure (Time) and their interactions with each individual effect (Time × UVBR, Time × WSF, and Time × UVBR × WSF). *indicates significance for $0.01 < p \leq 0.05$, ** for $0.001 < p \leq 0.01$, and * for $p \leq 0.001$. ns: not significant.**

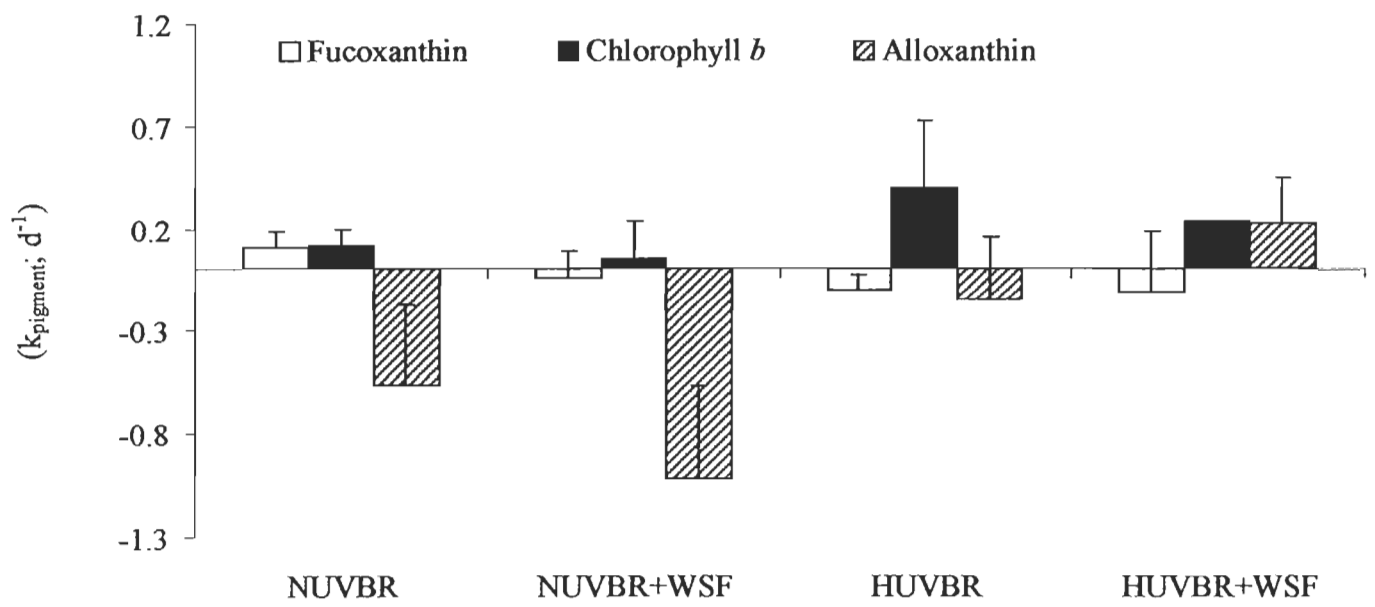
Parameters	Time	Time × UVBR	Time × WSF	Time × UVBR × WSF
Chl <i>a</i>	***	***	*	*
Total abundance <20 μm	***	***	**	ns
nanophytoplankton abundance	***	***	*	ns
FSC of nanophytoplankton	**	***	ns	ns
SSC of nanophytoplankton	*	*	ns	ns
Picophytoplankton abundance	***	***	***	***
FSC of picophytoplankton	*	ns	ns	ns
SSC of picophytoplankton	***	ns	*	*
F_v/F_m	***	***	ns	ns
Total bacterial abundance	***	ns	ns	ns
HNA bacterial abundance	***	ns	ns	ns
SSC of HNA bacteria	***	ns	ns	ns
FLI of HNA bacteria	***	ns	**	ns
LNA bacterial abundance	***	***	*	ns
SSC of LNA bacteria	***	*	*	ns
FLI of LNA bacteria	***	*	***	***
CFU bacterial abundance	***	***	***	***
CFU/TC ratio	***	***	***	***

Figure 5. Temporal changes in total Chl *a* concentrations. ^aSignificant differences relative to NUVBR, ^{a,b}significant differences relative to NUVBR+WSF, and ⁺significant differences relative to HUVBR. (// no available data for day 2). (Means + SD).



The major taxon-specific pigments detected were fucoxanthin, Chlorophyll *b*, and alloxanthin (Table 3). Fucoxanthin was the most abundant accessory pigment representing mostly diatoms (dominated by the pennate diatom *Pseudonitzschia* spp.; Ferrario & Ferreyra, comm. pers.) and showed the same spatial and temporal trends as Chl *a*. As Chl *a* increased in NUVBR treatment, fucoxanthin reached final value of $2.35 \pm 0.35 \mu\text{g l}^{-1}$, whereas in HUVBR+WSF, the treatment with the lowest final Chl *a* value (i.e. $0.16 \pm 0.05 \mu\text{g l}^{-1}$), fucoxanthin concentration was only $0.05 \pm 0.01 \mu\text{g l}^{-1}$ (Table 3). Fucoxanthin concentrations peaked up to 1.38 ± 0.40 , and $0.55 \pm 0.01 \mu\text{g l}^{-1}$ following separate WSF addition and enhanced UVBR exposure, respectively. The other taxon-specific pigments identified in phytoplankton cells is Chl *b* which is an indicator of the presence of green algae such as Euglenophytes and Chlorophytes, and alloxanthin which is an unequivocal marker for only one group of algae, the Cryptophytes (Mantoura 1997). Results revealed that all pigments were significantly ($p < 0.05$) reduced with increasing stress (i.e. WSF addition >enhanced UVBR exposure >and co-exposure to both WSF and UVBR). Moreover, growth rates of specific algal groups (Fig. 6), as determined by equation (3), demonstrated that fucoxanthin-containing cells were halted under single and dual stresses whereas there were no significant effects of the treatment (WSF and/or enhanced UVBR) on growth rate of Chl *b*-containing cells. Interestingly, HUVBR+WSF treatment was the only one to exhibit a growth rate of alloxanthin-containing cells.

Figure 6. Growth rates (k_{pigment} ; d^{-1}) calculated for the marker pigments: Fucoxanthin, Chlorophyll *b*, and alloxanthin. (Means + SD).



Thereafter, each specific pigment was expressed as Chl *a* ratio. No differences were observed between treatments, except for the allo:Chl *a* ratio with a significant ($p < 0.05$) higher value in HUVBR+WSF treatment. It was also observed that enhanced UVBR exposure alone resulted in a significant ($p < 0.05$) lower β -carotene:Chl *a* ratio. According to total photoprotective (PPCs) and photosynthetic (PSCs) carotenoids:Chl *a* ratios (Table 3), significant higher values of PPCs were observed under both enhanced UVBR treatments, with an increase of ~50% relative to NUVBR, whereas no difference was observed for PSCs.

Flow cytometry results: abundance and physiology of cells

Temporal changes in total abundance of phytoplankton cells $< 20\mu\text{m}$ are presented in Fig. 7. MANOVA results (Table 2) showed significant Time effect ($p < 0.001$) as well as Time \times UVBR ($p < 0.001$) and Time \times WSF ($p < 0.01$) interactions. During the first two days a slight increase was observed with no significant differences between treatments. WSF effects appeared on day 3 with lower values for both WSF-added treatments ($p < 0.05$) relative to NUVBR treatment. Under NUVBR treatment, abundance reached a final value of $8104 \pm 639 \text{ cells ml}^{-1}$, whereas significantly lower values were recorded for NUVBR+WSF ($5023 \pm 1101 \text{ cells ml}^{-1}$; $p < 0.01$), HUVBR ($2328 \pm 886 \text{ cells ml}^{-1}$; $p < 0.01$), and HUVBR+WSF ($1045 \pm 57 \text{ cells ml}^{-1}$; $p < 0.001$). Moreover, significant differences were

observed between WSF-added treatments ($p < 0.001$), and between NUVBR+WSF and HUVBR treatments.

Phytoplankton cells $< 20 \mu\text{m}$ were mainly composed by two distinct fractions as determined by flow cytometry analysis using their cellular characteristics (i.e. FSC; cell size and SSC; shape): nanophytoplankton (cells $> 2 \mu\text{m}$) and picophytoplankton (cells $< 2 \mu\text{m}$) (Fig. 8). For nanophytoplanktonic fraction and relative to NUVBR treatment, WSF addition (NUVBR+WSF treatment) induced no significant changes in both FCS and SSC values, whereas enhanced UVBR exposure resulted in a significant ($p < 0.05$) increase in cell size and shape. MANOVA results demonstrated a Time effect ($p < 0.001$) as well as Time \times UVBR ($p < 0.001$) only (Table 2). However, for picophytoplanktonic fraction interactions between Time and WSF, as well as between Time, UVB, and WSF were additionally observed (Table 2). The co-exposure to both stress resulted in significant differences between HUVBR+WSF and NUVBR+WSF treatments as well as between HUVBR+WSF and HUVBR treatments at the end of the experiment. Moreover, this fraction appeared to be more sensitive to WSF addition with significant differences between NUVBR and NUVBR+WSF treatments at the end of the experiment.

According to the specific phytoplanktonic fractions identified, estimated growth rates (k ; d^{-1} ; Table 4) showed different sensitivity whatever the stress or the combination of both. Picophytoplankton exhibited the highest % inhibition, contrasting with nanophytoplankton which exhibited no significant inhibition relative to the WSF addition.

Moreover, MANOVA results show that abundance of picophytoplankton cells were subjected to synergistic interactions between UVBR and WSF with time, whereas significant Time, Time \times UVBR, and Time \times WSF interactions only were observed for abundance of nanophytoplankton (Table 2).

Table 3. Final pigment concentrations ($\mu\text{g l}^{-1}$) in the four treatments. Pigment types are abbreviated as follows: Fucoxanthin (Fuco), Alloxanthin (Allo), Chlorophyll *b* (Chl *b*), diadinoxanthin (DD), Diatoxanthin (DT), and *b*-carotene (*b*-carotene). Total concentrations in total photoprotective carotenoids (PPCs) and photosynthetic carotenoids (PSCs) pigments as well as total carotenoids (CAROs) are also presented. Thereafter, Pigments:Chl *a* ratio was calculated for each pigment or type of pigment and presented in parentheses with significant differences in bold. *Algal division/classe identified in the present study with their corresponding pigments. (Means \pm SD).

Treatment	Pigments ($\mu\text{g l}^{-1}$)						PPCs	PSCs	CAROs
	Fuco	Allo	Chl <i>b</i>	DD	DT	β -caroten			
NUVBR	2.35 \pm 0.35	0.17 \pm 0.05	1.11 \pm 0.61	1.28 \pm 0.16	0.09 \pm 0.03	0.39 \pm 0.07	2.09 \pm 0.25	2.35 \pm 0.35	4.44 \pm 0.51
(Chl <i>a</i> ratio)	(0.38 \pm 0.04)	(0.03 \pm 0.01)	(0.17 \pm 0.06)	(0.21 \pm 0.05)	(0.02 \pm 0.01)	(0.06 \pm 0.00)	(0.30 \pm 0.08)	(0.33 \pm 0.05)	(0.64 \pm 0.12)
NUVBR+WSF	1.38 \pm 0.40	0.09 \pm 0.06	0.64 \pm 0.05	0.56 \pm 0.15	0.11 \pm 0.08	0.16 \pm 0.07	1.06 \pm 0.17	1.38 \pm 0.40	2.44 \pm 0.56
(Chl <i>a</i> ratio)	(0.56 \pm 0.27)	(0.04 \pm 0.04)	(0.25 \pm 0.06)	(0.22 \pm 0.09)	(0.05 \pm 0.05)	(0.06 \pm 0.03)	(0.32 \pm 0.06)	(0.40 \pm 0.11)	(0.72 \pm 0.16)
HUVBR	0.55 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01	0.26 \pm 0.13	0.48 \pm 0.03	0.03 \pm 0.03	0.06 \pm 0.01	0.72 \pm 0.00	0.55 \pm 0.01	1.28 \pm 0.00
(Chl <i>a</i> ratio)	(0.38 \pm 0.03)	(0.03 \pm 0.01)	(0.18 \pm 0.07)	0.33 \pm 0.01	(0.02 \pm 0.03)	(0.04 \pm 0.00)	(0.42 \pm 0.02)	(0.33 \pm 0.01)	(0.75 \pm 0.03)
HUVBR+WSF	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.03	0.04 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.07 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.12 \pm 0.00
(Chl <i>a</i> ratio)	(0.34 \pm 0.21)	(0.19 \pm 0.00)	(0.17 \pm 0.24)	(0.28 \pm 0.05)	(0.00 \pm 0.00)	(0.00 \pm 0.00)	(0.49 \pm 0.06)	(0.35 \pm 0.23)	(0.84 \pm 0.29)

*Algal division/classe with corresponding pigments

Diatoms Chl *a*/Chl *c1,c2*/**Fuco**/Diadino/Diato/ β -carot/Canthaxanthin

Euglenophyceae Chl *a*/**Chl *b***/*b*-carot/Diadino/Diato/Zea/Neoxanthin/Canthaxanthin/Syphonein

Cryptophyceae Chl *a*/Chl *c2*/**Alloxanthin**/ α -carot

**Figure 7. Temporal changes of total abundance of phytoplankton cells <20 μm .
^aSignificant differences relative to NUVBR, and ^{a,b}significant differences
relative to NUVBR+WSF, and ⁺significant differences relative to HUVBR.
(Means + SD).**

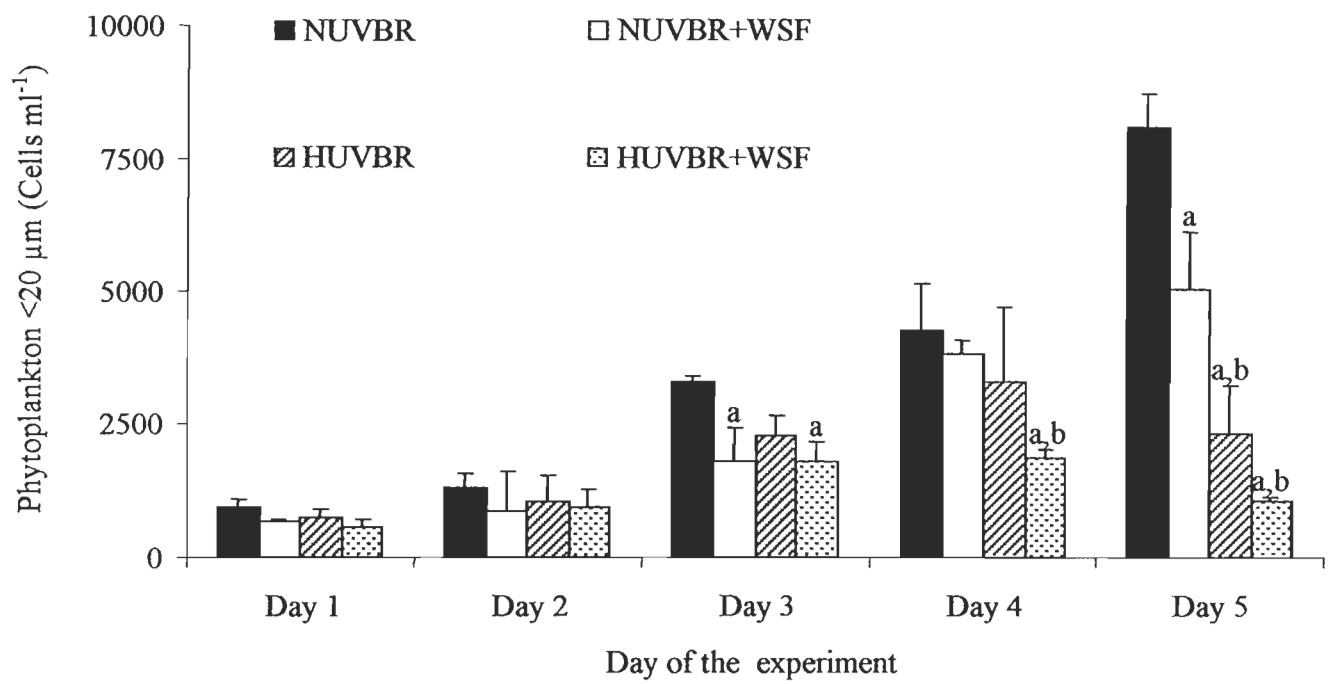
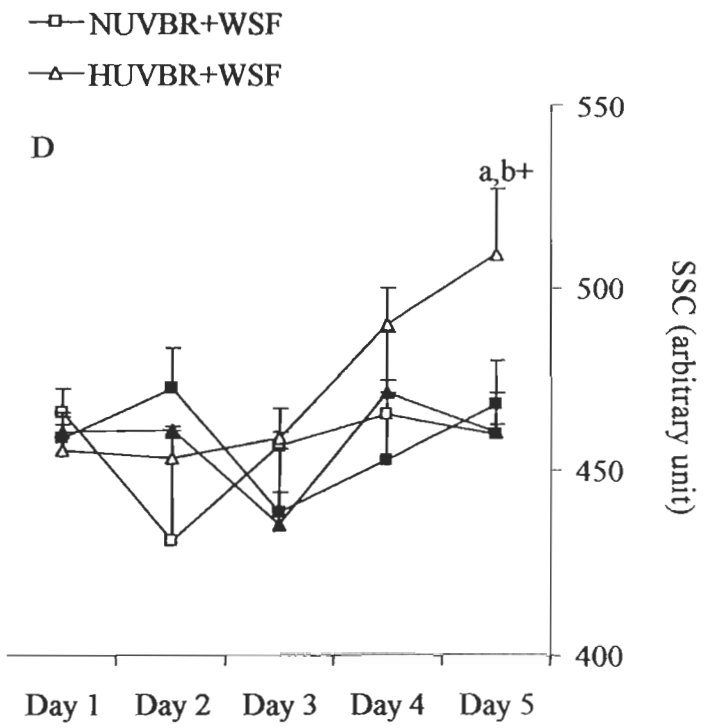
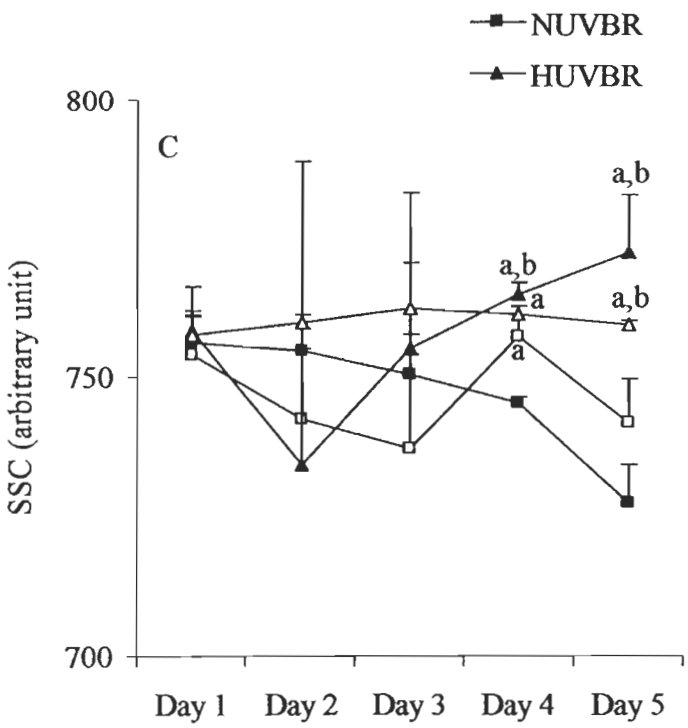
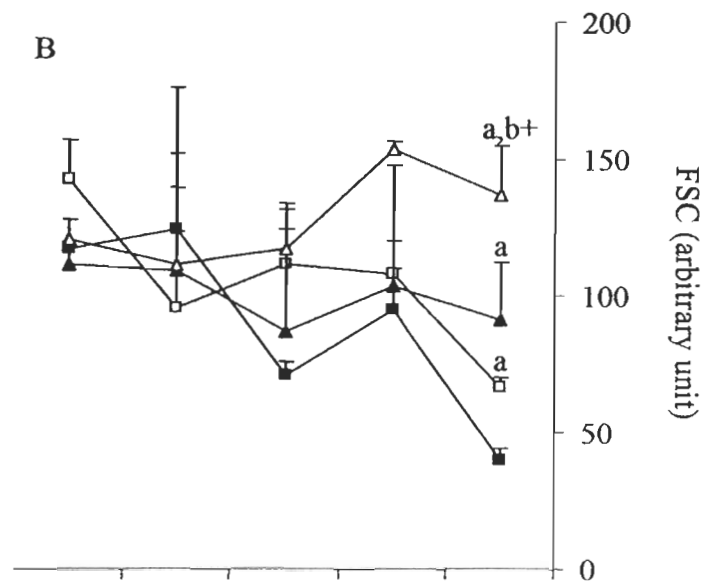
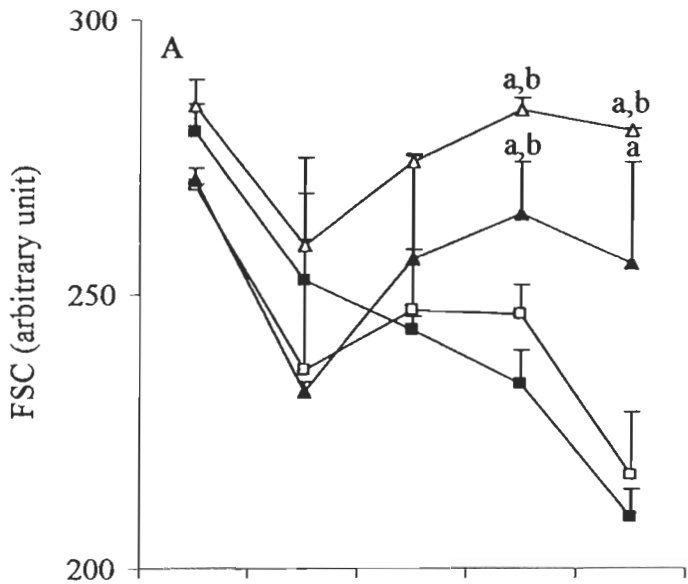


Figure 8. Temporal changes in FSC for (A) nanophytoplanktonic fraction and (B) picophytoplanktonic fraction, and temporal changes in SSC for (C) nanophytoplanktonic fraction, and (D) picophytoplanktonic fraction. ^aSignificant differences relative to NUVBR, ^{a,b}significant differences relative to NUVBR+WSF, and ⁺significant differences relative to HUVBR. (Means + SD).



Day of the experiment

■ NUVBR □ NUVBR+WSF
 ▲ HUVBR △ HUVBR+WSF

Table 4. Growth rates ($k; d^{-1}$) calculated between day 1 and day 5, for total cells <20 μm , picophytoplankton, and nanophytoplankton cells. Inhibition of growth rate is shown as % decrease from growth rate observed in NUVBR treatment for each phytoplankton assemblage. ^aSignificant differences relative to NUVBR, ^{a,b}significant differences relative to NUVBR+WSF, and ⁺significant differences relative to HUVBR. (Means + SD).

	NUVBR	NUVBR+WSF	HUVBR	HUVBR+WSF
Total cells <20 μm	0.55 \pm 0.03	0.50 \pm 0.06	0.28 \pm 0.05 ^{a,b} (-27%)	0.16 \pm 0.05 ^{a,b} (-39%)
Picophytoplankton	0.57 \pm 0.05	0.35 \pm 0.05 ^a (-22%)	0.19 \pm 0.05 ^{a,b} (-38%)	0.08 \pm 0.02 ^{a,b+} (-49%)
Nanophytoplankton	0.54 \pm 0.05	0.52 \pm 0.06	0.30 \pm 0.04 ^{a,b} (-24%)	0.18 \pm 0.07 ^{a,b} (-36%)

Results from cytometric analysis of the bacterial assemblage showed a number of total heterotrophic bacteria of $3.04 (\pm 0.12) \times 10^6$ cells ml^{-1} at the beginning of the experiment (Fig. 9A). No significant differences were observed between treatments throughout the rest of the experiment, as illustrated by MANOVA results showing only a significant interaction with Time effect (Table 2). Therefore, the only noticeable observation was a significant ($p < 0.0001$) increase of the mean cell abundance with time, up to $10.04 (\pm 1.23) \times 10^6$ cells ml^{-1} on day 3. Thereafter, bacterial abundance decreased up to $7.39 (\pm 1.01) \times 10^6$ cells ml^{-1} by the end of the experiment.

Flow cytometric analysis allowed to distinguish two subgroups within the bacterial assemblage, according to their SSC and FL1 values. A group of cells with high nucleic acid content (HNA cells) was discriminated from another group of cells with low nucleic acid contents (LNA cells) (Servais et al. 2003). Temporal changes of their abundances are presented in Figure 9B,C. As for the total bacterial abundance, HNA cells demonstrated only a temporal trend, but no significant differences between treatments were found throughout the experimental period. These HNA bacteria accounted for most of the total abundance (~70%). Such lack of significant differences between treatments was also reflected in SSC and FL1 values, where no major differences were observed between treatments, excepted on day 3 (Fig. 10A, C). However, abundance of LNA cells exhibited significant differences between treatments, from day 3 to the end of the experiment. WSF addition resulted in a significant final higher LNA abundance (i.e. increased value of ~10%, relative to NUVBR treatment) whereas WSF addition under enhanced UVBR

induced the lowest observed abundance (i.e. decreased value of 36%, relative to NUVBR treatment), with a significant interaction between UVBR and WSF ($p < 0.01$). Indeed, UVBR effect was also observed by the end of the experiment, when a significant decreased abundance of 21% occurred, relative to NUVBR treatment. Moreover, cellular characteristics of LNA cells demonstrated significant Time \times UVBR and Time \times WSF interactions (SSC and FL1 values) and Time \times UVBR \times WSF interactions (FL1 values) (Table 2). Precisely, following few hours after WSF addition, LNA cells presented significant higher cell size (SSC) and higher nucleic acid contents (FL1) in both WSF-added treatments relative to both WSF-free treatments (Fig. 10B, D). Thereafter, significant differences were observed between WSF-added treatments, with highest cell size and nucleic acid contents for HUVBR+WSF. Interestingly, although enhanced UVBR did not induce significant changes in cell size of LNA cells (SSC values), a significant interaction between UVR and WSF was recorded. On the other hand, UVBR effects were observed for nucleic acid contents (FL1 values under HUVBR treatment). Values decreased throughout the experiment and were significantly different ($p < 0.05$) from those of NUVBR treatment. (HUVBR).

Heterotrophic bacterial counts

Before the start of the experiment (Day 0), samples of Ushuaia Bay revealed that only 1163 cells ml^{-1} were culturable (data not shown). Once the experiment started, both

WSF-added treatments reacted similarly, i. e. 8 h after WSF addition (Fig. 11). These treatments presented significant ($p < 0.005$) increase in CFU values than WSF-free treatments. On day 2 both NUVBR+WSF and HUVBR+WSF treatments showed a 2-fold increase in CFU counts compared to other treatments. The final value observed under NUVBR+WSF treatment (4.5×10^5 cells ml⁻¹) was 56, 76 and 85.6 % higher than final values observed under HUVBR+WSF, NUVBR and HUVBR treatments, respectively. MANOVA results showed a significant Time effect, as well as significant Time \times UVBR, Time \times WSF, and finally Time \times UVBR \times WSF interactions ($p < 0.001$; Table 2).

Figure 9. Temporal changes in (A) total bacterial abundance, (B) HNA bacterial abundance, and (C) LNA bacterial abundance, as determined by flow cytometry. ^aSignificant differences relative to NUVBR, ^{a,b}significant differences relative to NUVBR+WSF, and ⁺significant differences relative to HUVBR. (Means + SD).

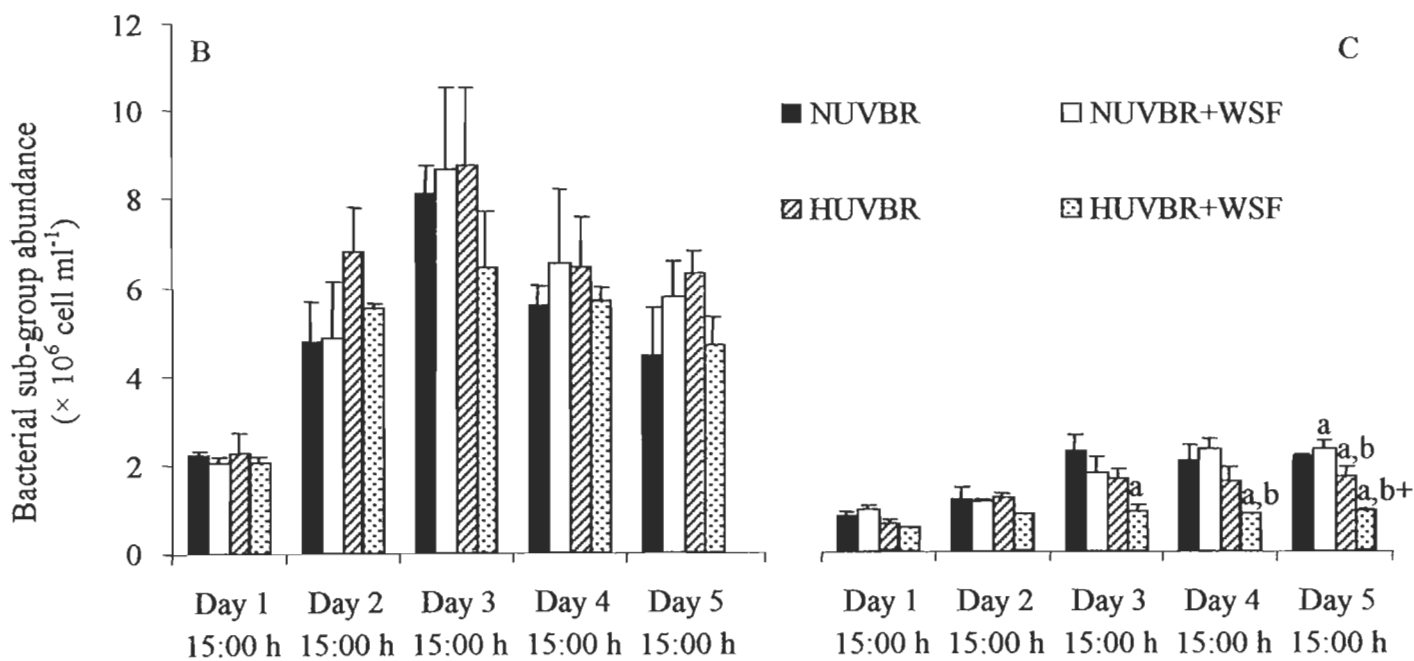
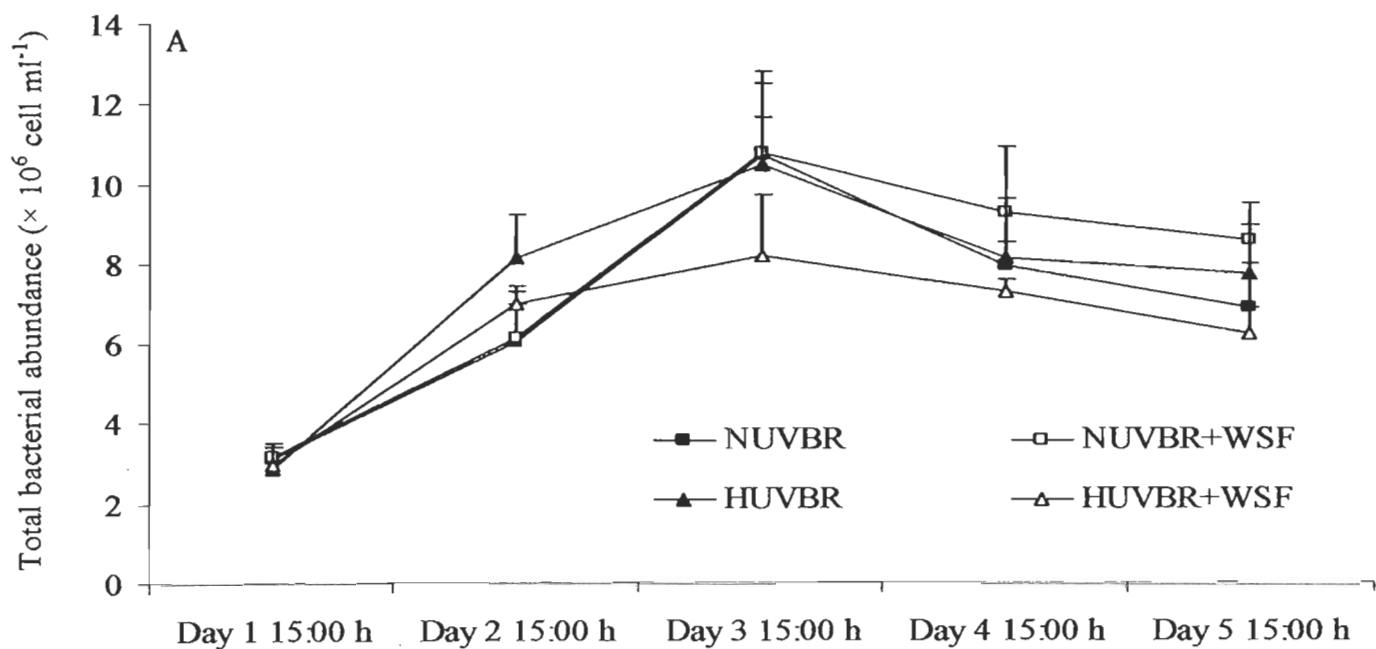
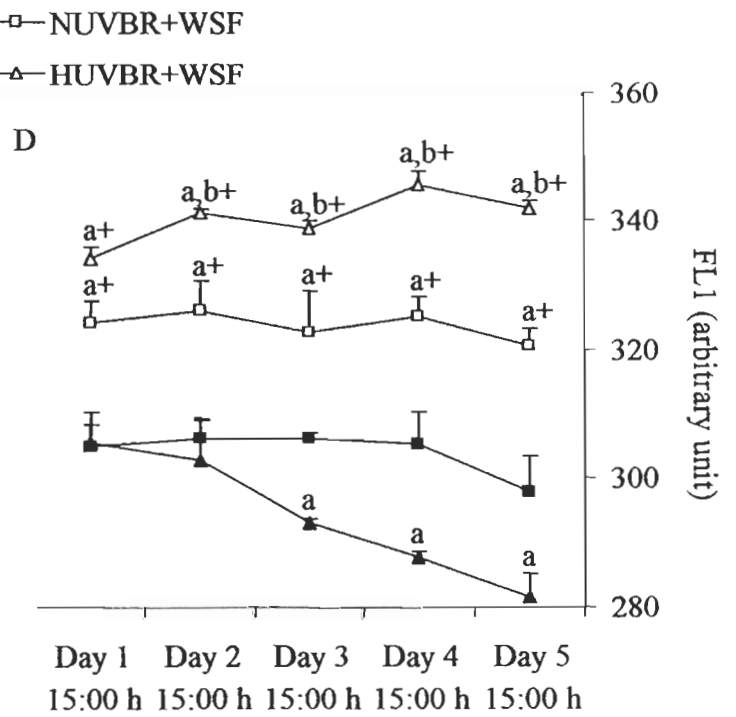
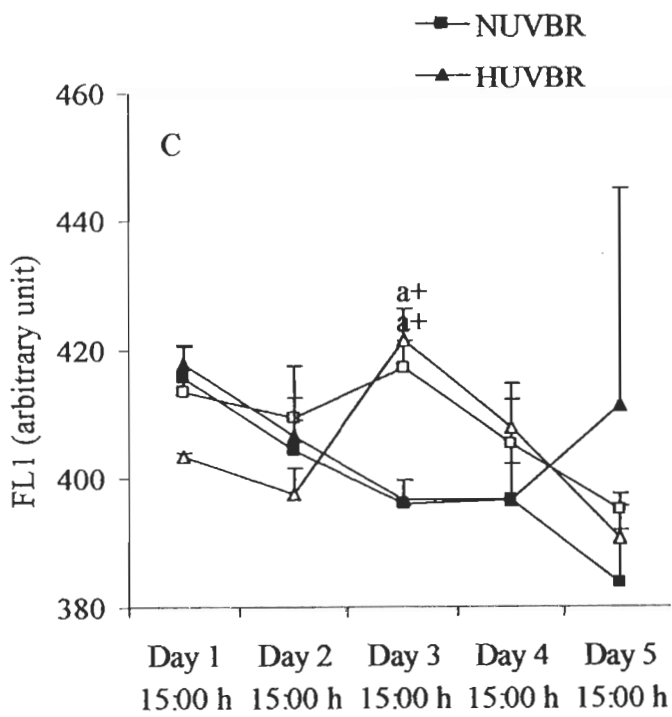
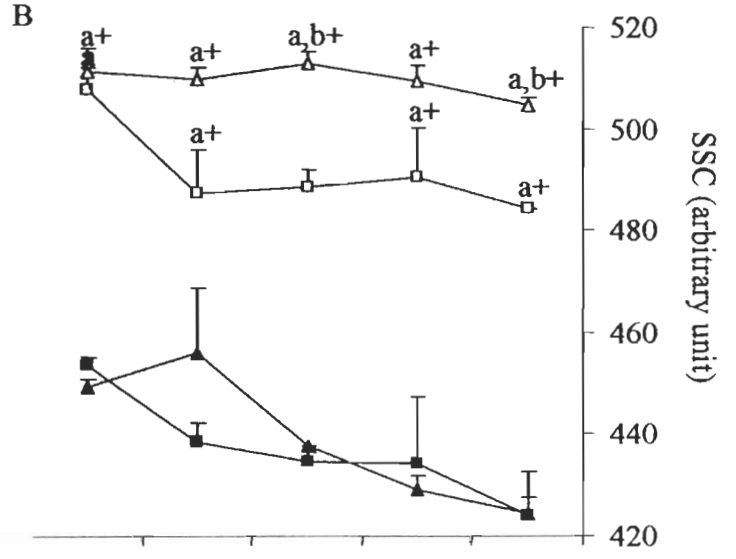
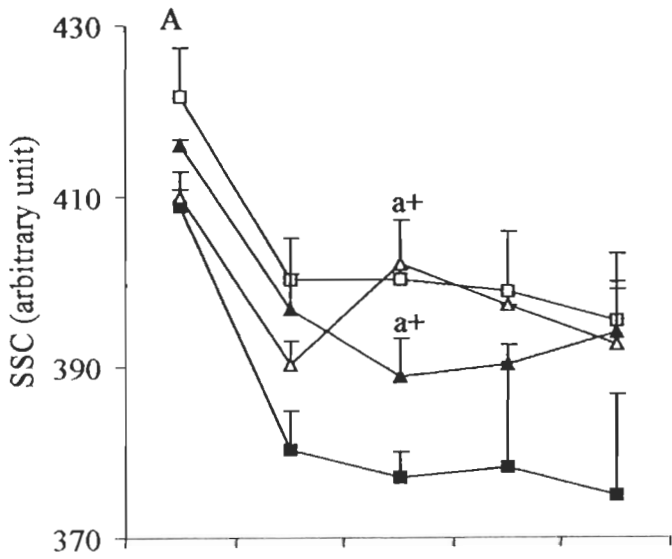


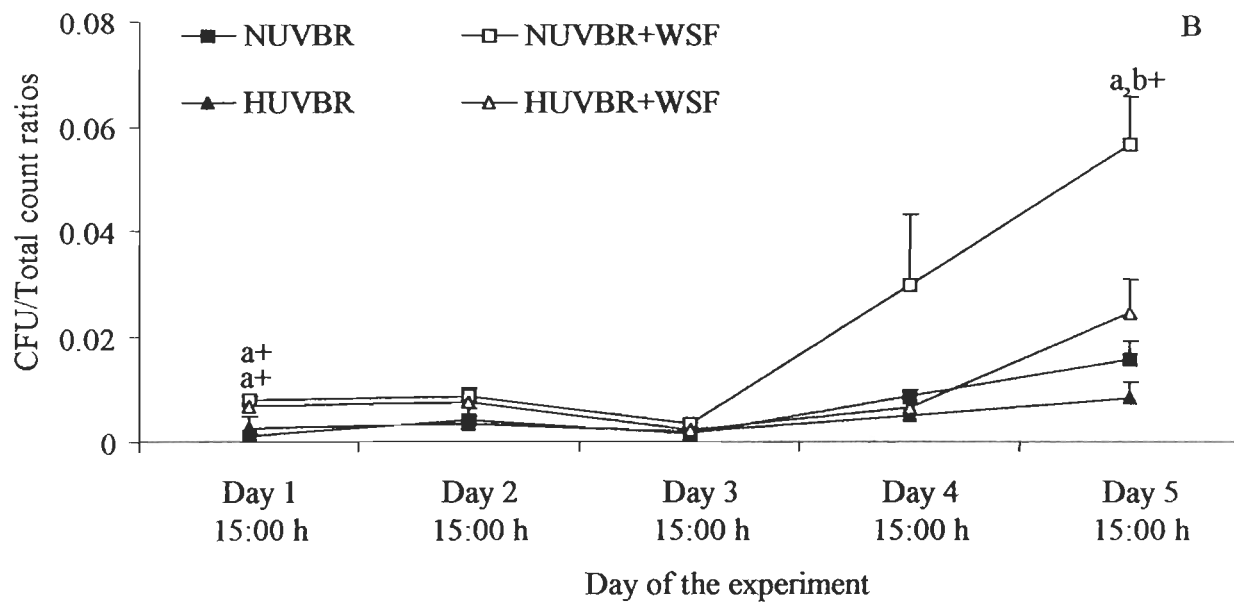
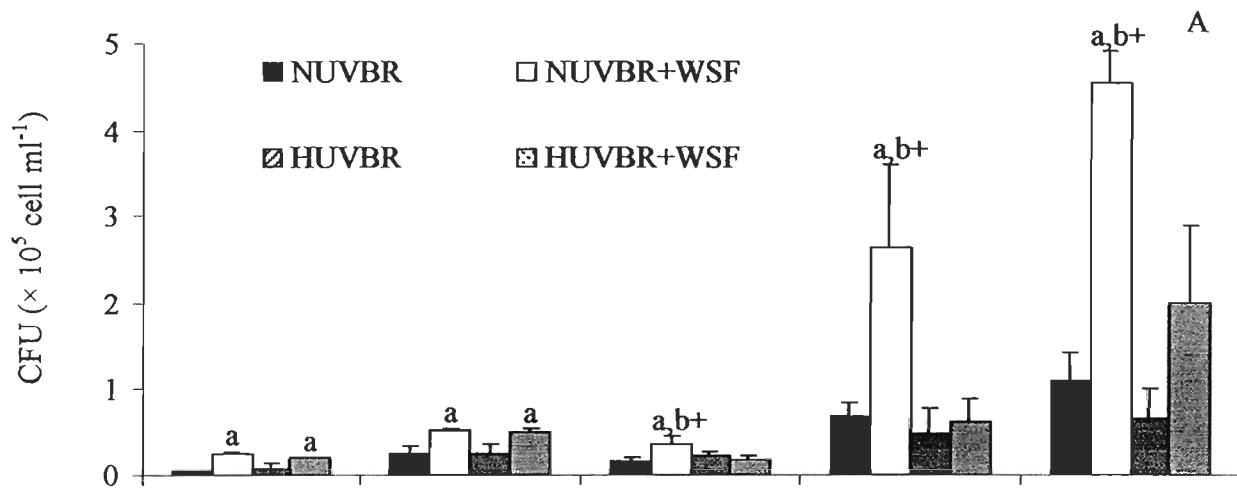
Figure 10. Temporal changes in SSC for (A) HNA bacteria and (B) LNA bacteria, and temporal changes in FL1 for (C) HNA bacteria, and (D) LNA bacteria. *Significant differences relative to NUVBR, ^{a,b}significant differences relative to NUVBR+WSF, and ⁺significant differences relative to HUVBR. (Means + SD).



■ NUVBR □ NUVBR+WSF
 ▲ HUVBR △ HUVBR+WSF

Day of the experiment

Figure 11. Temporal changes in (A) bacterial colony forming unit (CFU) as determined by the spread plate method on Tryptone Soy Agar (TSA; Oxoid), and (B) CFU:Total bacterial abundance ratio. ^{*}Significant differences relative to NUVBR, ^{a,b}significant differences relative to NUVBR+WSF, and ⁺significant differences relative to HUVBR. (Means + SD).



DISCUSSION

Oil production and transport are among the most important economic activities in Patagonia, with development of offshore oil fields that may result in oil spills following accidents, transfer to cope operations and ballast discharges (Instituto Argentino del Petróleo: <http://www.iapg.org.ar/iapg/>). Moreover, South Patagonia, and particularly Ushuaia city, serves as a base for touristic cruise ships to Antarctica, as a source of potential hydrocarbon wastes that may affect marine ecosystems. In addition to such anthropogenic pollution, these sub-Antarctic marine ecosystems have periodically with increasing UVBR levels due to the influence of the Antarctic ozone hole that reaches the southern part of South America in early spring (Villafañe et al. 2001). Many studies have demonstrated the role of UVR in affecting aquatic ecosystems (de Mora et al 2000, Helbling & Zagarese 2003; and references therein). However only few have considered the effects of potential interactions between such UVBR-induced effects with anthropogenic pollution at the base of the marine food web (i.e. phyto- and bacterioplankton) (Marwood et al. 1999, Sargian et al. in press). The present study provides the first evidence of synergistic effects of dissolved hydrocarbons and enhanced UVB level on a natural planktonic assemblage from a sub-Antarctic aquatic ecosystem, with the presence of an extremely sensitive planktonic assemblage when exposed to multiple stresses.

UVBR effects on the natural planktonic assemblage

Enhanced UVBR could result in a photosynthetic inhibition via reactive oxygen species generated by photosensitization, and damage to D1 protein of PS II (Marwood *et al.*, 2000). However, in the present investigation, the low afternoon values of F_v/F_m following a period of high irradiance (HUVBR treatment) can be considered as a consequence of dynamic photoprotective processes acting to reduce the excitation pressure on PS II (Heraud & Beardall 2000). Indeed, recovery of F_v/F_m during the night-time is a good indication that regulation, rather than damages to PS II, has taken place. Moreover, by the end of the experiment, the UVBR-induced decrease in photochemical yield was much lower than for the previous days. Such a regulation could come from the higher ratio of PPCs (with diadinoxanthin dominance) to Chl *a* relative to the ratio of PSCs to Chl *a* observed under HUVBR treatment, whereas the opposite situation occurred under NUVBR treatment with PSCs (with fucoxanthin dominance) concentrations higher than those of PPCs.

Except for the diadinoxanthin:Chl *a* ratio, there were no indications of pigment shifts between both UVBR treatments, suggesting that no shifts in the species composition had occurred. However, growth rates of major-taxon pigments illustrated the UVBR sensitivity of fucoxanthin-containing cells. Therefore, the decrease in Chl *a* content as well as in other accessory pigments could therefore be attributed to a loss of biomass, primarily

from diatoms (death, DNA damages), or direct photooxydation of pigments (physiological response to enhanced UVBR; Xenopoulos & Schindler 2003).

When addressing the size dependence of UVBR effects, and particularly subgroups of cells $<20 \mu\text{m}$, the differential sensitivity between pico- and nanophytoplankton cells should be noted. The largest ones were affected in their physiological characteristics, with a coupled increase in cell size and shape, whereas the smallest ones exhibited significant changes only in their cell size. These results can be explained by model calculations of Garcia-Pichel (1994) indicating that while nano- and microphytoplankton cells may contain enough photoprotective pigments to confer protection, the small volume of picophytoplankton cells precludes this strategy. In the present study, the coupled increase in mean cell size and shape of nanophytoplankton cells can be related to the increase in photoprotective pigments observed under HUVBR treatment, relative to NUVBR. The biosynthesis of these compounds can prevent DNA damages by increasing the UVBR pathlength within cells (Karentz et al. 1991). Moreover, it can contribute to explain the lower growth rate inhibition (-24%) observed for nanophytoplankton cells compared to observed rate for picophytoplankton cells (-38%), relative to the NUVBR treatment. Indeed, Helbling et al. (2001) demonstrated that picophytoplankton cells seemed to be more vulnerable to DNA damage. The observed increase in the mean cell size can be explained by UVBR-induced DNA damages that cause inhibition of DNA replication, which is a precondition for cell division (Buma et al. 1996). As a consequence of these DNA damages, reduction in growth rates were observed in this study, in agreement with

previous UVBR studies (Karentz et al. 1991, Behrenfeld et al. 1992, Buma et al. 1996, Mostajir et al. 1999).

The above results suggest that the phytoplankton assemblage, sampled right after the local spring algal bloom (Longhi 2003), appeared to be able to photoadaptation and therefore to be more resistant to photosynthetic inhibition. However, the abundance of phytoplankton cells $<20\ \mu\text{m}$, as well as total biomass (Chl *a*) did not increase as expected from recovery of photochemical yield achieved by the end of the experiment, suggesting important losses, and particularly DNA damages and direct photooxydation of pigments.

The absence of significant effects of UVBR on total abundance of bacterioplankton observed in the present study could be the consequence of a balance between direct negative effects like DNA damages (Mitchell, 1995, Peak & Peak 1995), and potentially positive effects of decreased grazing pressure and increase in food supply from UVBR-stressed phytoplanktonic cells (Kaiser & Herndl 1997). However, when observing the two identified bacterial subgroups (i.e. HNA and LNA bacteria), a significant decrease in abundance of LNA bacteria was noted by the end of the experiment following UVBR exposure, as well as in their activity throughout the experiment (based on their fluorescence signal FL1), suggesting their high vulnerability to UVBR-induced damages.

WSF effects on the natural planktonic assemblage

Some WSF effects were detected on the phytoplanktonic assemblage, but at a lesser extent than those induced by the enhanced UVBR exposure. Hydrocarbons are efficient photosensitizers resulting in the formation of free radicals as primary mode of their toxic action (Huang et al. 1997, Mallakin et al. 1998). Free radicals have been implicated in lipid peroxidation which can lead to membrane destabilization and subsequent toxicity. However, the absence of significant WSF effect on photochemical yield suggests that WSF concentration was not strong enough to induce such sub-cellular effects, and NUVBR+WSF treatment followed a similar pattern than that observed under natural UVBR condition.

However, WSF addition resulted in significant effects on phytoplankton composition and biomass. Final Chl *a* content was depressed of ~58%, relative to NUVBR treatment, and can be directly attributed to some toxic effects on diatoms, as WSF primarily impeded the growth rate of fucoxanthin-containing cells. Such results corroborate previous findings about the high susceptibility of diatoms to hydrocarbons (Siron et al. 1996), due to the fact that porous silica structure is a good absorbent of hydrocarbons and that the frustules of the diatoms absorb and retain these compounds (Karydis 1982) facilitating subsequent toxicity.

Thereafter, and following bioaccumulation, dissolved hydrocarbons can react directly with macromolecules (Sikkema et al. 1995) or cause DNA damages due to reactive

oxygen species (ROS) (Bagchi et al. 1998). Such toxic effects resulted in the present study in a significant growth rate decrease of about 22% for picophytoplankton cells. Photoprotective carotenoid pigments involved in preventing direct harmful UVBR effects, and particularly UVBR-induced ROS, could also act as antioxidants protecting from the toxic action of ROS generated by photosensitization of hydrocarbons, as demonstrated by Gala & Giesy (1993). Therefore, this size specific-sensitivity to WSF addition between nano- and picophytoplankton cells could be explained by the incapacity of the smallest ones to produce such effective photoprotective pigments. As suggested by Garcia-Pichel (1994), small cells cannot physically accumulate enough sunscreens pigments (i.e. MAAs) due to their small cell volume, and therefore it can be assumed the same for photoprotective carotenoid pigments. Accordingly, natural occurring photoprotective pigments observed under NUVBR+WSF could have been sufficient to prevent nanophytoplankton cells from WSF toxicity, whereas picophytoplankton cells were directly affected.

Major WSF-induced effects were however observed on the bacterioplankton assemblage and more specifically on CFU. Whereas WSF addition did not result in significant effects on total nor HNA bacterial densities, LNA bacteria displayed an increasing abundance that can be related to the increasing CFU. Indeed, only 8h after WSF addition, LNA bacteria already exhibited significant higher cell size and nucleic acid content, and thereafter throughout the experiment, suggesting an increase in carbon availability (i.e. WSF addition) for bacterial growth and activity. Further molecular studies, from DNA analysis of these bacterial groups using PCR-amplified 16S rRNA sequences,

are presently under way. These results will give us information about bacterial species specific composition of this LNA subgroups. It should be noted however that the concomitant increase in CFU suggests the development of specialized hydrocarbons degrading bacteria. Such enhancement of specific microorganisms has been previously reported in marine sub-Antarctic environments (Delille & Delille 2000). Whereas LNA bacteria were previously categorized as dead or inactive cells (Lebaron et al. 2001, 2002), the present study tends to demonstrate that this bacterial sub-group can be favoured under stressed conditions, and they can be at least as active as other components of the assemblage (Zubkov et al. 2001).

Relevance of the UVBR and WSF co-exposure

At the exception of photochemical yield, many of the above effects were significantly exacerbated when the planktonic assemblage was exposed to both WSF addition and enhanced UVBR, which suggests the presence of synergistic effects. Indeed, significant interactions between both stresses during the experiment were observed for Chl α content and abundance of phytoplankton, and particularly for picophytoplanktonic cells and their cellular characteristics and growth rate. Addressing the size-dependence sensitivity of both phytoplankton fractions, it was interesting to note how the picophytoplankton cells were affected. Whereas neither enhanced UVBR, nor WSF

addition alone induced significant changes in cell shape, the combination of both stresses resulted in a higher mean cell shape of these smallest cells.

Under HUVBR+WSF treatment, diatoms were depressed and the absence of detectable diatoxanthin and β -carotene suggests that Chl-*b* containing cells were somewhat affected. We showed that the β -carotene:Chl *a* ratio decreased in response to enhanced UVBR exposure, but did not change significantly with WSF addition. However, co-exposure to dual stresses resulted in no more quantifiable β -carotene. Either this HUVBR+WSF treatment selected for growth of phytoplankton with relatively low carotene chlorophyll *a*⁻¹ or the treatment affected the carotene content of some portion of the phytoplanktonic assemblage. However, one of the most interesting findings was the apparent growth rate of alloxanthin-containing cells (identified by optical microscopy study as *Cryptomonas* sp.; Ferrario & Ferreyra, preliminary taxonomic data). Growth rate of this species was depressed under both natural and enhanced UVBR conditions as well as following WSF addition under NUVBR treatment. This can be related with the high UV sensitivity of cryptomonads due to their small size and associated larger surface area:volume ratio (Vernet et al. 1994).

Under HUVBR+WSF treatment, WSF addition as well as exudates and products of cell lysis from UVBR-stressed phytoplankton could have represented an additional carbon source, therefore supporting bacterial growth, as demonstrated by the significant increase in cell size and nucleic acid content, relative to WSF addition under natural UVBR conditions.

However, abundance of LNA under dual stresses did not follow the same trend than that observed under NUVBR+WSF treatment. This can be attributed to an increasing grazing pressure in this treatment from *Cryptomonas* sp., which can switch between phototrophic and mixotrophic as an adaptative strategy (Bergmann 2004).

CONCLUSIONS

The lack of synergistic effects between UVBR and WSF was previously demonstrated in a northern experiment conducted at springtime (Sargian et al. in press). These results were attributed to the greater impact of WSF (i.e. 10 mg l⁻¹) which was strong enough to exceed the potential deleterious effects of UVBR, resulting in no detectable combined effects (i.e. additive or synergistic). We therefore hypothesized that synergistic or additive effects could probably take place at lower concentrations (i.e. chronic inputs of hydrocarbons into aquatic systems) representative of more typical situations in coastal areas. In the present study, this hypothesis was confirmed with the lower initial WSF concentration applied (i.e. 5 mg l⁻¹). The present results illustrate that the plankton assemblage influenced periodically by the ozone hole was physiologically stressed and more susceptible to WSF toxicity than those from the less enhanced UVBR impacted sites resulting in synergistic effects of both stresses, with a shift in species composition, both in the bacterio- and phytoplankton assemblages.

REFERENCES

- Ankley GT, Collyard SA, Monson PD, Kosian PA (1994) Influence of ultraviolet light on the toxicity of sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem* 13: 1791-1796
- Arfsten DP, Schaeffer DJ, Mulveny DC (1996) The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of PAH in animals and plants: a review. *Ecotoxicol Environ* 33: 1-24
- Austin J, Butchart N, Shine KP (1992) Possibility of an Arctic ozone hole in a doubled-CO₂ climate. *Nature* 360: 221-225
- Bagchi M, Bagchi D, Balmoori J, Ye X, Stohs SJ (1998) Naphthalene-induced oxidative stress and DNA damage in cultured macrophage J774A.1 cells. *Free Rad Biol Med* 25: 137-143
- Behrenfeld MJ, Hardy JT, Lee II H (1992) Chronic effects of ultraviolet-B radiation on growth and cell volume of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 28: 757-760
- Bergmann TI (2004) The physiological ecology and natural distribution patterns of cryptomonad algae in coastal aquatic ecosystems. Doctorat Thesis Graduate School-New Brunswick, New Jersey: 144p
- Braumann TH, Gropper TH, Damn I, Grimme LH (1984) Function of chlorophylls and carotenoids in thylakoid membranes. Pigment bleaching in relation to PS-I and PS-

- II activity of subchloroplast particles prepared with digitonin. In Sybesma C (Ed) *Advances in Photosynthesis Research. V. II.* Kluwer Acad. Pub. Group, Boston: 137-140
- Buma AGJ, Van Hannen EJ, Roza L, Veldhuis MJW, Gieskes WWC (1996) Monitoring ultraviolet-B induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimer detection. *J Phycol* 31 : 314-321
- Cullen JJ, Neale PJ, Lesser MP (1992) Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. *Science* 258: 646-650
- Delille D, Bouvy M (1989) Bacterial responses to natural organic inputs in marine Sub-Antarctic area. *Hydrobiol* 182: 225-238
- Delille D, Delille B (2000) Field observations on the variability of crude oil impact on indigenous hydrocarbon-degrading bacteria from sub-Antarctic intertidal sediments. *Mar Environ Res* 49: 403– 417
- Diamond SA, Milroy NJ, Mattson VR, Heinis LJ, Mount DR (2003) Photoactivated toxicity in amphipods collected from polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated sites. *Environ Toxicol Chem* 22: 2752-2760
- Duquesne S, Liess M (2003) Increased sensitivity of the macroinvertebrate *Paramorea walkeri* to heavy-metal contamination in the presence of solar UV radiation in Antarctic shoreline waters. *Mar Ecol Prog Ser* 255: 183-191
- Frederick JE, Soulen PF, Smolskaia I, Booth CR, Lucas T, Neuschuler D (1993). Solar ultraviolet irradiance observed from Southern Argentina: September 1990 to March 1991. *J Geophys Res* 98: 8891-8897

- Frederick JE, Diaz SB, Smolskaia I, Esposito W, Lucas T, Booth CR (1994). Ultraviolet solar radiation in the high latitudes of South America. *Photochem Photobiol* 60: 356-362
- Gala WR, Giesy JP (1993) Using the carotenoid biosynthesis inhibiting herbicide, fluoridone, to investigate the ability of carotenoid pigments to protect algae from the photo induced toxicity of anthracene. *Aquat Toxicol* 27: 61-70
- Garcia-Pichel F (1994) A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol Oceanogr* 39: 1704-1717
- Geider RJ, La Roche J, Greene RM, Olaizola M (1993) Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *J Phycol* 29: 755-766
- Grumbach KH (1984) Does the chloroplast envelop contain carotenoids and quinones in vivo ? *Physiol Plant* 60: 180-186
- Helbling EW, Chalker BE, Dunlap WC, Holm-Hansen O, Villafañe VE (1996) Photoacclimation of Antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *J Exp Mar Biol Ecol* 204: 85-101
- Helbling EW, Villafañe VE, Ferrario M, Hom-Hansen O (1992) Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar Ecol Prog Ser* 80: 89-100

- Huang XD, Dixon DG, Greenberg BM (1993) Impacts of ultraviolet radiation and photomodification on the toxicity of PAHs to the higher plant *Lemna gibba* L. G-3 (duckweed). *Environ Toxicol Chem* 12: 1067-1077
- Huang XD, McConkey BJ, Babu TS, Greenberg BM (1997) Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: Inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (Duckweed). *Environ Toxicol Chem* 16: 1707-1715
- Instituto Argentino del Petróleo. <http://www.iapg.org.ar/iapg/>
- Kaiser E, Herndl GJ (1997) Rapid recovery of marine bacterioplankton activity after inhibition by UV radiation in coastal waters. *Appl Environ Microbiol* 63: 4026-4031
- Karentz D, Cleaver JE, Mitchell DL (1991) Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J Phycol* 27: 326-341
- Karydis M (1982) Toxicity of a photooxidised crude oil on two marine microalgae. *Bot Mar* XXV: 25-29
- Lebaron P, Parthuisot N, Catala P (1998) Comparison of Blue Nucleic Acid yes for Flow Cytometric numeration of Bacteria in Aquatic Systems. *Appl Environ Microbiol* 64: 1725-1730
- Lebaron P, Servais P, Agogué H, Courties C, Joux F (2001) Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems ? *Appl Environ Microbiol* 67: 1775-1782

- Lebaron P, Servais P, Baudoux A-C, Bourrain M, Courties C, Parthuisot N (2002) Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquat Microb Ecol* 28: 131-140
- Liess M, Champeau O, Riddle M, Schulz R, Duquesne S (2001) Combined effects of ultraviolet-B radiation and food storage on the sensitivity of the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* to copper. *Environ Toxicol Chem* 20: 2088-2092
- Longhi ML (2003) L'influence de l'état nutritionnel du phytoplancton sur la réponse au rayonnement UV-B à différentes latitudes. Ms. Thesis, UQAR, Ca.: 74p
- Mallakin A, McConkey BJ, Miao G, McKibben B, Snieckus V, Dixon DG, Greenberg BM (1998) Impacts of structural photomodification on the toxicity of environmental contaminants: Anthracene photooxidation products. *Ecotox Environ Saf* 43: 204-212
- Mantoura RFC (1997) Phytoplankton pigments in oceanography : guidelines to modern methods. *Monogr Oceanogr Method*: 661p
- Marwood CA, Smith REH, Solomon KR, Charlton MN, Greenberg BM (1999) Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assemblages of lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation. *Ecotox Environ Saf* 44:322-327
- McDonald BG, Chapman PM (2002) PAH phototoxicity-an ecologically irrelevant phenomenon ? *Mar Pollut Bull* 44: 1321-1326

- Mitchell DL (1995) Ultraviolet radiation damage to DNA, In: Meyer RA (Ed) *Molecular biology and biotechnology: a comprehensive desk reference*. VCH Publishers, New York: 939-943
- Molina MJ, Rowland FS (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature* 249: 810-812
- Mostajir B, Demers S, de Mora S, Bukata RP, Jerome JH (2000) Implications of UV radiation for the food web structure and consequences on the carbon flow. In de Mora S, Demers S, Vernet M (Eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge Environmental Chemistry, University Press: 310-320
- Mostajir B, Sime-Ngando T, Demers S, Belzile C, Roy S, Gosselin M, Chanut J-P, De Mora S, Fauchot J, Vidussi F, Levasseur M (1999) Ecological implications of changes in cell size and photosynthetic capacity of marine *Prymnesiophyceae* induced by ultraviolet-B radiation. *Mar Ecol Prog Ser* 187: 89-100
- Nikkilä A, Penttinen S, Kukkonen JVK (1999) UV-B induced acute toxicity of pyrene to the waterflea *Daphnia magna* in natural freshwaters. *Ecotoxicol Environ Saf* 44: 271-279
- Peak MJ, Peak JG (1995) Photosensitized reactions of DNA. In: Horspool WM, Song P (Eds) *Handbook of organic photochemistry and photobiology*. CRC Press, Boca Raton, FL: 1318-1325
- Porra RJ, Pfundel EE, Engel N (1997) Metabolism and function of photosynthetic pigments. In Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (Eds) *Phytoplankton pigments in oceanography*. UNESCO, Paris: 85-126

- Preston BL, Snell TW, Kneisel R (1999) UV-B exposure increases acute toxicity of pentachlorophenol and mercury to rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environ Pollut* 106: 23-31
- Ondrusek ME, Bidigare RR, Sweet ST, Defreitas DA, Brooks JM (1991) Distribution of phytoplankton pigments in the North Pacific Ocean in relation to physical and optical variability. *Deep-Sea Res* 38: 243-266
- Rex M, Salawitxh RJ, von der Gathen P, Harris NRP (2004) Arctic ozone loss and climate change. *Geophys Res Lett* 31: LO4116
- Roy S (2000) Strategies for the minimisation of UV-induced damage. In de Mora S, Demers S, Vernet M (Eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, Cambridge: 177-205
- Sargian P, Mostajir B, Chatila K, Ferreyra GA, Pelletier É, Demers S (in press) Non-Synergistic Effects of Water Soluble Crude Oil And Enhanced Ultraviolet-B Radiation On A Natural Planktonic Assemblage. *Mar Ecol Progr Ser*
- Servais P, Casamayor OE, Courties C, Catala P, Parthuisot N, Lebaron P (2003) Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquat Microbiol Ecol* 33: 41-51
- Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbial Rev* 59: 201-222
- Siron R, Pelletier É, Roy S (1996) Effects of dispersed and adsorbed crude oil on microalgal and bacterial communities of cold seawater. *Ecotoxicol* 5: 229-251

- Strickland JDH, Parsons TR (1984) A practical handbook of seawater analysis. Fish Res Board Canada: 310p
- Vernet M, Brody EA, Holm-Hansen O, Mitchell BG (1994) The response of Antarctic phytoplankton to ultraviolet radiation: absorption, photosynthesis, and taxonomic composition. In Weiler CS, Penhale PA (Eds) Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects. Antarctic Res Ser, Washington DC 62: 143-158
- Villafañe VE, Helbling EW, Zagarese HE (2001) Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic systems of Patagonia, South America. *Ambio* 30: 112-117
- Vincent WF, Neale PJ (2000) Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. In de Mora S, Demers S, Vernet M (Eds) The effects of UV radiation in the marine environment. Cambridge Environmental Chemistry, University Press: 149-176
- Wakeham SG (1977) Synchronous fluorescence spectroscopy and its application to indigenous and petroleum-derived hydrocarbons in lacustrine sediments. *Environ Sci Technol* 11: 272-276
- Zapata M, Rodriguez F, Garrido JL (2000) Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C₈ column and pyridine-containing mobile phases. *Mar Ecol Prog Ser* 195: 29-45
- Zubkov MV, Fuchs BM, Burkill PH, Amman R (2001) Comparison of Cellular and Biomass Specific Activities of Dominant Bacterioplankton Groups in Stratified Waters of the Celtic Sea. *Appl Environ Microbiol* 67: 5210-5218

Zudaire L, Roy S (2001) Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. J Photochem Photobiol 62: 26-34

CHAPITRE 3

TBT TOXICITY ON A NATURAL PLANKTONIC ASSEMBLAGE EXPOSED TO ENHANCED ULTRAVIOLET- B RADIATION

Sargian P, Pelletier É, Mostajir B, Ferreyra GA, Demers S.

Sous presse dans la revue "Aquatic Toxicology"

RÉSUMÉ

Une approche en microcosme a été mise en place afin d'étudier les effets combinés du tributylétain (TBT) issu des peintures anti-salissures et du rayonnement ultraviolet-B (RUVB : 280-320 nm) sur un assemblage planctonique naturel ($< 150 \mu\text{m}$) de l'Estuaire du Saint-Laurent. Des microcosmes (sacs cylindriques en Téflon de 9 l; 75 cm de haut $25 \times \text{cm}$ de large) furent immergés dans la colonne de plus grands mésocosmes (sacs en polyéthylène de 1800 l et de 2,3 m de profondeur) et exposés à deux différents traitements de RUVB : RUVB naturel ambiant (NUVBR) et RUVB accru (HUVBR). Pendant 5 jours consécutifs, les effets du TBT (120 ng l^{-1}) et du RUVB accru (donnant lieu à un RUVB biologiquement pondéré de 2,15 fois plus important que les conditions naturelles) ont été évalués dans les traitements suivants : (i) RUVB ambiant sans TBT (NUVBR), (ii) RUVB ambiant avec TBT (NUVBR+TBT), et (iii) RUVB accru avec TBT (HUVBR+TBT). Chaque traitement a été ainsi conduit en triplicata. Différents paramètres ont alors été pris en compte au cours de l'expérience, à savoir des analyses de TBT, l'abondance et la productivité bactérienne, aussi bien l'abondance les caractéristiques cellulaires que les taux de croissance des cellules phytoplanctoniques et la fluorescence de la chlorophylle *a* (Chl *a*) *in vivo*. Suite à la contamination par le TBT (traitement NUVBR+TBT), les concentrations en Chl *a* n'ont jamais excédé $1 \mu\text{g l}^{-1}$ alors que des valeurs finales aussi élevées que $54 \mu\text{g l}^{-1}$ ont été mesurées dans le traitement non contaminé (traitement NUVBR). La contamination par le TBT a également conduit à une perte du signal de fluorescence de l'efficacité photosynthétique du photosystème II. De plus

la contamination par le TBT a entraîné une augmentation de la taille cellulaire moyenne du phytoplancton $< 20 \mu\text{m}$, ainsi que des changements dans la structure, reflétant une perturbation majeure du cycle cellulaire conduisant à une inhibition du taux de croissance apparent. Ces effets délétères du TBT ont conduit à une abondance finale des cellules phytoplanctoniques $< 20 \mu\text{m}$ de seulement $591 \pm 35 \text{ cellules ml}^{-1}$ alors que le traitement NUVBR avait une abondance finale de $31846 \pm 312 \text{ cellules ml}^{-1}$. De plus, lorsque les cellules ont été sujettes à la contamination par le TBT sous RUVB accru (traitement HUVBR+TBT), l'abondance finale n'était plus que de $182 \pm 90 \text{ cellules ml}^{-1}$, avec une interaction significative entre le TBT et le RUVB au cours des deux derniers jours de l'expérience. Une telle interaction a également été observée au niveau de l'abondance bactérienne, avec une stimulation de 226% due à la présence de TBT, et de 403% due à la présence de TBT sous RUVB accru, comparativement au traitement NUVBR. Si l'on considère la productivité bactérienne, la présence de TBT a conduit à une inhibition de 32%, et cette inhibition fut significativement plus importante sous l'influence des deux stress (i.e. 77% : traitement HUVBR+TBT). Ces résultats démontrent clairement que la combinaison TBT et RUVB a des effets synergiques affectant les premiers maillons du réseau trophique marin.

Mots-clés : rayonnement ultraviolet-B•tributylétain•effet synergique•assemblage planctonique naturel•phytoplancton et bactéries marines.

ABSTRACT

A microcosm approach was designed to study the combined effects of tributyltin (TBT) from antifouling paints and ultraviolet-B radiation (UVBR: 280-320 nm), on a natural planktonic assemblage (<150 μm) isolated from the St. Lawrence Estuary at the end of the springtime. Microcosms (9 l, cylindrical Teflon® bags, 75 cm height \times 25 cm width) were immersed in the water column of mesocosms (1800 l, polyethylene bags, 2.3 m depth) and exposed to two different UVBR regimes: natural ambient UVBR (NUVBR), and enhanced level of UVBR (HUVBR). During five consecutive days, effects of TBT (120 ng l^{-1}) and enhanced UVBR (giving a biologically weighted UVBR 2.15-fold higher than natural light condition) were monitored in the samples coming from following treatments: (i) NUVBR light condition without TBT (NUVBR), (ii) NUVBR light condition with TBT added (NUVBR+TBT), (iii) HUVBR light condition without TBT (HUVBR) and (iv) HUVBR light condition with TBT added (HUVBR+TBT). Each treatment was conducted in triplicate microcosms. Different parameters were then measured during 5 days, including TBT analysis, bacterial abundance and productivity, phytoplankton abundance, cellular characteristics and growth rates, as well as in vivo chlorophyll *a* (Chl *a*) fluorescence. Following TBT addition (NUVBR+TBT treatment), Chl *a* concentrations never exceeded $1\ \mu\text{g}\ \text{l}^{-1}$ whereas final values as high as $54\ \mu\text{g}\ \text{l}^{-1}$ were observed in TBT-free treatments (NUVBR and HUVBR). TBT addition resulted also in the loss of fluorescence signal of the maximum efficiency of the photosystem II in phytoplankton assemblage. TBT toxicity caused on phytoplankton <20 μm an increase of mean cell size and changes in shape

reflected a drastic disturbance of the cell cycle leading to an inhibition of the apparent growth rate. These negative effects of TBT resulted in a final abundance of phytoplankton <20 μm of 591 ± 35 cells ml^{-1} in NUVBR+TBT relative to NUVBR treatment (i.e. 31846 ± 312 cells ml^{-1}). Moreover, when cells were submitted to TBT under enhanced UVBR (HUVBR+TBT treatment), final abundance of phytoplankton <20 μm was only 182 ± 90 cells ml^{-1} , with a significant interaction between TBT and UVBR during the last two days of the experiment. The same type of interaction was also observed for bacterial abundance in NUVBR+TBT and HUVBR+TBT with stimulation of 226% and of 403%, respectively due to TBT addition relative to NUVBR treatment. When considering bacterial productivity, TBT addition resulted in an inhibition of 32%, and this inhibition was significantly more pronounced under dual stresses (i.e 77% in HUVBR+TBT). These results clearly demonstrate that the combination of TBT and UVBR stresses have synergistic effects affecting the first trophic levels of the marine food web.

Keywords: Ultraviolet-B radiation•Tributyltin•Synergistic effect•Natural planktonic assemblage•Marine phytoplankton and bacteria.

INTRODUCTION

Tributyltin (TBT) is an organometallic compound used as a biocide in antifouling paints. TBT exhibits a high toxic activity toward a variety of aquatic non-targeted organisms (Maguire, 2000), including phytoplankton (Mouhri et al., 1995; Huang et al., 1996; Sidharthan et al., 2002) and bacterioplankton (Cooney & Wuertz, 1989; Harino et al., 1997). Despite the current restrictions on any new applications of TBT, with a total ban to be enforced by January 2008, this organometal persists at concentrations considered as chronically toxic in coastal areas (Fent, 1996). Once released in aquatic environments, the TBT degradation proceeds as a sequential debutylation pathway (TBT $[\text{Bu}_3\text{Sn}^+]$ \Rightarrow Dibutyltin [DBT: $\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$] \Rightarrow Monobutyltin [MBT: BuSn^{3+}] \Rightarrow Tin [Sn : Sn^{4+}]) (Champ & Pugh, 1987) with a progressive decrease in toxic activity (Wong et al., 1982). Phytoplanktonic assemblages have been reported as potential degraders of TBT in aquatic environments (Seligman et al., 1986; Lee et al., 1989; Reader & Pelletier, 1992; Fent, 1996; Tsang et al., 1999) as well as bacterioplankton (White et al., 1999).

TBT degradation in aquatic environments also results from abiotic processes such as photolysis (Blunden & Chapman, 1982). Butyltin compounds essentially do not absorb wavelengths above 350 nm, and therefore only the ultraviolet (UVR: 280-400 nm), and essentially the ultraviolet-B radiation (UVBR: 280-320 nm) component of sunlight could cause the direct photodegradation of butyltins in surface waters (Maguire et al., 1983;

Navio et al., 1993). Although UVBR could significantly contribute to the disappearance of TBT in surface seawater, high energy solar radiations could also compromise biological processes.

With recent evidences of significant decrease of stratospheric ozone concentrations with the resulting UVBR increase in northern and southern polar regions as well as in temperate latitudes (Schindell et al., 1998; Tarasick et al., 2003), numerous investigations reported adverse UVBR effects on planktonic assemblages in both marine and freshwater ecosystems (Vincent & Roy, 1993; Mostajir et al., 1999a, b; Cabello-Pasini et al., 2000; Fauchot et al., 2000; Garde & Cailliau, 2000; Mousseau et al., 2000; Chatila et al., 2001; Davidson & Belbin, 2002; van Rijssel & Buma, 2002). Therefore, given the ubiquitous presence of pollutants in coastal waters, a growing body of research has emerged in the last few years where complex interactions between UVBR and pollutants have been considered (McConkey et al., 1997; Mallakin et al., 1998; Liess et al., 2001; Duquesne & Liess, 2003; Sargian et al., 2005).

In the present study, we addressed the following questions: What could be the effect of enhanced UVBR on the already well-established toxicity of TBT for planktonic species growing and reproducing in the surface layer (a few cm) of the marine water column? How enhanced UVBR level could reduce (i.e. photodegradation) or increase (i.e. photosensibilization) TBT toxicity towards microorganisms? Can we expect a synergistic effect of TBT and UVBR on phytoplankton rather than a simple additive effect? What could be the reaction of the heterotrophic bacterial community when phytoplankton is

strongly affected by toxicants? These questions can not be addressed by direct field observations of the planktonic community in coastal waters and require an experimental approach as close as possible of the real world. We developed a microcosm approach where a portion of a natural planktonic assemblage was taken from a healthy coastal system (undetected butyltins contamination). This assemblage was isolated in Teflon® bags and exposed for a few days to well-characterized light and environmental conditions mimicking the simultaneous presence of dissolved TBT and enhanced UVBR. This approach was simultaneously employed in conducting experiments with dissolved hydrocarbons and UVBR (Sargian et al., 2005) and with dissolved TBT reported here. Enhanced UVBR levels effects alone were previously presented and readers are referred to the appropriate sections of Sargian et al. (2005).

MATERIAL & METHODS

Experimental set-up

The experimental set-up, including general environmental characteristics and experimental light conditions, has been previously described in details (Sargian et al., 2005). Briefly, microcosms (9l-cylindrical Teflon® bags, 75 height × 25 cm width; Fig. 1) were immersed in larger mesocosms (clear polyethylene bags; 2.3 m deep, volume of ~1800 l) placed in the water column and attached to a wharf structure located in a marina on the south shore of the lower St. Lawrence Estuary, eastern Canada (48.6°N; 68.2°W). Two UVBR light regimes were used: natural (NUVBR), and high (HUVBR). In the latter treatment, the natural UVBR intensity was enhanced using four fluorescent lamps (Philips TL40W-12RS; emission peak at 313 nm), suspended 40 cm above water surface, and was adjusted to mimic a 60% ozone depletion conditions, according to the model of Diaz et al. (2000). Lamps were turned on from 10:00 to 15:00 h each day.

The water sample for the experiment was collected on 17th June 2000 from the St. Lawrence Estuary (48.3°N, 68.3°W) at a 5 m depth and then transferred by boat to the marina. The mesocosms were then filled simultaneously. After two days of UVBR pre-exposure, microcosms were filled with water from their respective UVBR regimes, after screening the water sample through a 150 µm Nitex™ mesh to exclude larger grazers. TBT was then added to microcosms producing the following combinations: (i) NUVBR light

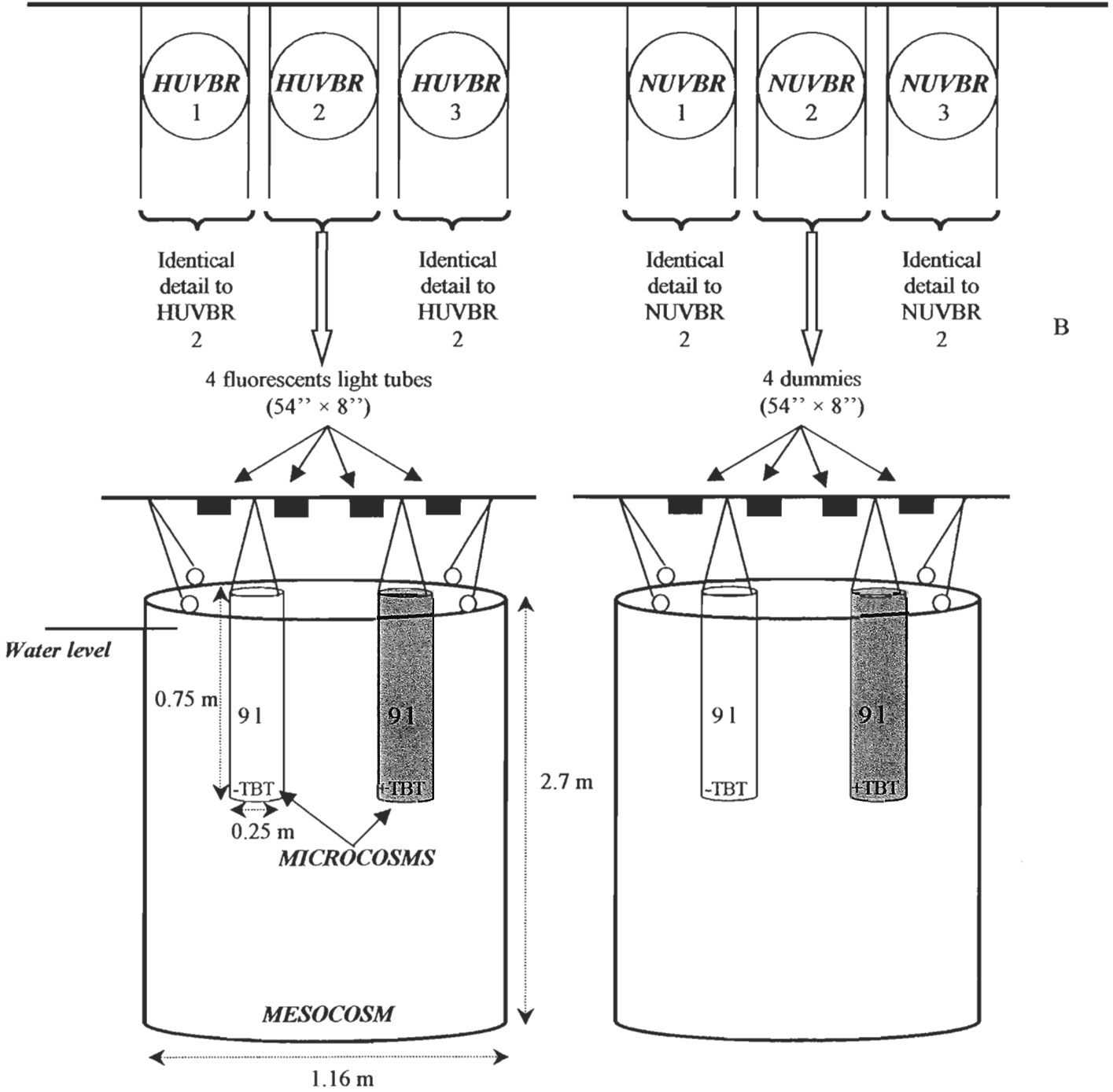
condition without TBT (NUVBR), (ii) NUVBR light condition with TBT added (NUVBR+TBT), (iii) HUVBR light condition without TBT (HUVBR), and (iv) HUVBR light condition with TBT added (HUVBR+TBT) (Fig. 1). Each treatment was conducted in triplicate microcosms. The present work was carried out during 5 days from the 20th to 24th of June 2000. Before each sampling (Table 1), each microcosm content was manually homogenized and then water samples siphoned out at half-depth of the water column.

Incident irradiance at 313 nm (UVBR), 380 nm (UVAR), and PAR was recorded every 10 min using a GUV surface radiometer (Biospherical Instruments) to characterize the light environmental conditions during the experiment (Table 2). Except for day 2 where we got rain (21 June), the experimental period was mostly sunny. Underwater irradiances at 313, 320, 340 and 380 nm, and PAR were also recorded to assess vertical light profiles in mesocosms using a PUV-500 underwater radiometer (Biospherical Instrument) at 10:00, 12:30, and 14:30 h daily. The attenuation coefficients throughout the water column ($K_d(\lambda)$, m^{-1}) were calculated as well as mean depth of 1% of surface irradiance, for all wavelengths considered (Table 2), and were consistent with previously reported values for the St Lawrence Estuary (Levasseur et al., 1984; Kuhn et al., 1999). In HUVBR treatments, the unweighted and weighted UVBR was 1.59 and 2.15-fold higher than the NUVBR treatments (Sargian et al., 2005) (Fig. 2).

Figure 1. Outline of the microcosms employed, (A) viewed from the top describing the general position of the mesocosm structure, and (B) viewed from the side, demonstrating the microcosm position inside mesocosm.

A

Wharf structure



B

Figure 2. Mean integrated daily irradiances at 313, 320, 340 and 380 nm, and PAR, for sunny days just below water surface in NUVBR and HUVBR treatments.

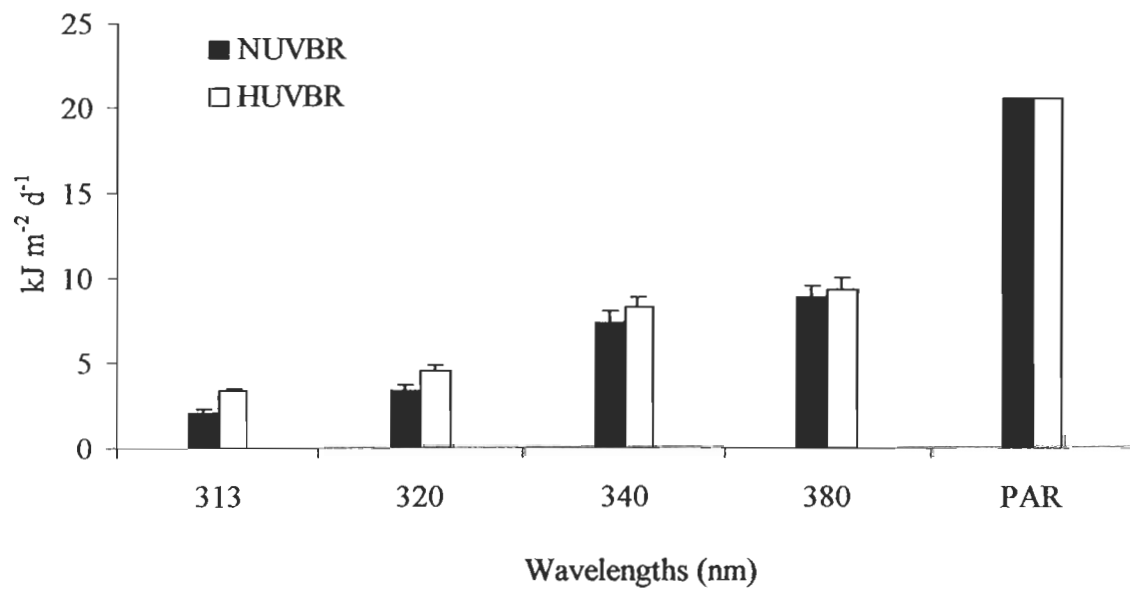


Table 2. Daily integrated incident irradiance at 313, 320, 340, and 380 nm, and PAR measured over the experimental period using a GUV radiometer, and apparent attenuation coefficients (K_d , m^{-1}) for the same wavelengths as derived from irradiance depth profiles in the mesocosms and the corresponding depth of 1% light near surface irradiance (0 m).

Date	313 nm ($kJ\ m^{-2}\ d^{-1}$)	320 nm ($kJ\ m^{-2}\ d^{-1}$)	340 nm ($kJ\ m^{-2}\ d^{-1}$)	380 nm ($kJ\ m^{-2}\ d^{-1}$)	PAR ($E\ m^{-2}\ d^{-1}$)
20 June	5.06	9.18	17.13	23.26	59.31
21 June	2.12	3.98	7.65	10.09	25.75
22 June	5.19	8.66	15.27	20.75	53.41
23 June	5.57	9.92	17.17	23.15	58.34
24 June	5.37	8.87	17.18	23.29	60.37
K_d (m^{-1})	4.86 ± 0.26	4.37 ± 0.10	3.45 ± 0.17	1.95 ± 0.17	0.57 ± 0.14
Depth of 1% light (m)	0.95 ± 0.05	1.05 ± 0.02	1.34 ± 0.07	2.38 ± 0.20	8.92 ± 2.33

Tributyltin addition and chemical analyses

To simulate a TBT concentration of moderately contaminated coastal waters of about 100 ng l^{-1} (De Mora, 1996), one ml of tributyltin chloride (TBTCl; 97%) was dissolved in ethanol (10 ml), followed by two dilutions in water to get a final concentration of $1.08 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$. One ml of this stock solution was added in each 9l-microcosm dedicated to the study of combined effects of TBT and UVBR. The nominal concentration was then $120 \text{ ng TBT l}^{-1}$ (i.e. 0.3 nM).

For determination and quantification of butyltin compounds (TBT, DBT and MBT), water samples (1 l) were siphoned out at half-depth of the water column of the microcosm immediately following TBT addition (day 1) and thereafter on days 3 and 5 for chemical analysis (Michel & Averty, 1999). Samples were first filtered on Whatman GF/F filters ($0.7 \text{ } \mu\text{m}$ pore size) and filtered samples were thereafter transferred in conical flasks where $300 \text{ } \mu\text{l}$ of NaBEt_4 , and 5 ml of pentane:isooctane (ratio 1:4) mixture were added to each flask. Manual stirring for 10 min allowed extraction of butyltin compounds. After decantation and addition of internal standard tetrapentyltin ($100 \text{ } \mu\text{l}$ of TpSn ; 2 ppm), the extract was concentrated under nitrogen jet to 0.5 ml. One ml of isooctane was then added and the volume adjusted to 1.0 ml. This final volume was then transferred into 8-ml amber vials and placed at -80°C for later analysis.

Quantification of butyltin compounds were carried out with a Varian 3300 gas chromatograph (GC) fitted with a DB-5MS silica capillary column (i.d. 0.25 mm , length 30

m), and with helium as carrying gas. GC was coupled with ionic detection (GC-ITD) (Perkin-Elmer, Finnigan).

Technical problems with analytical equipments caused an important delay of 12 months in the analysis of stored samples and it was subsequently impossible to detect butyltin compounds in all filtered samples. A complementary short-term assay conducted with a natural planktonic assemblage sampled at the same location and exposed to similar TBT and UVBR conditions indicated that TBT was actually preserved in both filtered and unfiltered samples after at least 8 h of incubation which means that TBT and metabolites were most probably present in microcosms throughout the experiment, but their absence in long-term store samples was probably due to sample conservation problems.

For dissolved nitrate+nitrite and phosphate analyses, 100 ml samples were filtered each day (7:00 h a.m.) through precombusted Whatman GF/F filters and stored at -80°C until analysis with a Technicon IITM autoanalyser system, according to Parsons et al. (1984).

Biological analyses

For total chlorophyll *a* (Chl *a* > 0.7 μm) measurements, 100 ml of samples were filtered each day (7:00 h a.m.) on Whatman GF/F filter. Concentrations were determined with a Turner Designs fluorometer (model 10-005R) according to the method described by Parsons et al. (1984).

Furthermore, *in vivo* Chl *a* fluorescence was determined using a pulse amplitude modulated (PAM) fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). Daily samples (20 ml) collected at 15:00 h were dark adapted for 30 min to allow for relaxation of non photochemical-quenching and then initial fluorescence (F_0) was measured, i.e. when all reaction centers of photosystem II (PS II) are open and can accept incoming electrons for photosynthesis. Then, saturating pulse was applied to measure maximal fluorescence (F_m), i.e. when all PS II centers are closed. The ratio of variable to maximal fluorescence ($F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$) was calculated (Krause & Weis, 1991), and corresponds to the photochemical yield of open PS II reaction centers which is used as an indicator of photoinhibition.

To describe changes in the phytoplanktonic assemblage, samples were obtained twice a day at 7:00 a.m. and 15:00 h during the 5 days of the experiment. Analyses were performed immediately after sampling on duplicate 2-ml fresh samples with a FACSort analyser flow cytometer (FCM, Becton-Dickinson) equipped with a 488 nm laser and operated at high rate ($60 \mu\text{l min}^{-1}$). Fluorescent beads (Polyscience, Inc) were added to all samples, as internal standards. Abundance of phytoplankton cells $< 20 \mu\text{m}$ was detected using natural cellular fluorescence (red FL3: $> 650 \text{ nm}$, attributed to Chl *a*). In addition to abundance estimates, flow cytometry allows to quantify changes in cellular characteristics of different phytoplankton sub-populations i.e. small- and large phytoplankton cells, using forward light scatter (FSC: primarily related to cell size) and side scatter (SSC; associated with a variety of factors including refractive index, granularity and cell shape). The cell

refractability is related to surface properties and internal structure and these affect FSC and SSC. All cytometric data were logged using Cell Quest® and then analyzed with Attractor® software, both from Becton-Dickinson.

Based on the apparent increase in abundance observed in natural condition (NUVBR treatment), apparent growth rates (k , d^{-1}) were calculated for the period between day 1 (7:00 a.m.) and the end of the experiment (day 5 15:00 p.m.) as follow (equation 1) :

$$k = \frac{\ln N_{D_5} - \ln N_{D_1}}{D_5 - D_1}$$

equation 1

Where N_{D_5} and N_{D_1} are cell abundances at final time D_5 and initial time D_1 , respectively.

Bacterial abundance was estimated as bacterial DAPI-counts (Porter & Feig, 1980). Samples (10 ml) were collected twice per day at 7:00 h a.m. and 15:00 p.m.. They were filtered onto black polycarbonate membrane filters (Poretics; 0.2 μm size pore), stained with 4',6-diamidino-2-phenolindole (DAPI; 50 $\mu\text{g l}^{-1}$) (Sigma) and mounted on slides before enumeration using a Zeiss epifluorescence microscope. Bacterial production was measured using the ^3H -thymidine (^3H -TdR) incorporation technique according to Smith & Azam (1992). Activity was calculated as thymidine incorporation rates (Total Activity, TA: pmol

TdR $l^{-1} h^{-1}$) according to Furhman & Azam (1982). TA was thereafter normalized to bacterial abundance to estimate the cell-specific incorporation of thymidine (Specific Activity, SA: $pmol\ TdR\ cell^{-1}\ h^{-1}$).

Chl *a* concentrations and total abundance of phytoplankton <20 μm for NUVBR+TBT and HUVBR+TBT were represented as % decrease relative to NUVBR treatment (natural conditions) as follow (equation 2):

$$\% \text{ decrease} = \frac{(\text{NUVBR+TBT or HUVBR+TBT}) \text{ values} \times 100}{\text{NUVBR values}}$$

equation 2

Phytoplankton growth rates, as well as bacterial abundance and specific activity were represented as % inhibition/stimulation, relative to NUVBR treatment (natural conditions) as follows (equations 3 and 4) :

$$\% \text{ stimulation} = \frac{(\text{NUVBR+TBT or HUVBR+TBT}) \text{ values} \times 100}{\text{NUVBR values}} - 100$$

equation 3

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{(\text{NUVBR} + \text{TBT or HUVBR} + \text{TBT}) \text{ values} \times 100}{\text{NUVBR values}}$$

equation 4

Statistical analyses

Due to the fact that repeated measurements were made during several days on the same experimental units (microcosms), a repeated-measure multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed to assess time effects and time \times treatment interactions for the different parameters measured (Scheiner & Gurevitch, 1993). Thereafter, a two-factor ANOVA (TBT and UVBR) was applied to determine whether differences exist among the means for a given day, and particularly to determine possible TBT and UVBR interactions. In addition, a post-hoc pairwise multiple comparisons Tukey test was performed at each sampling time in order to detect significant differences between treatments.

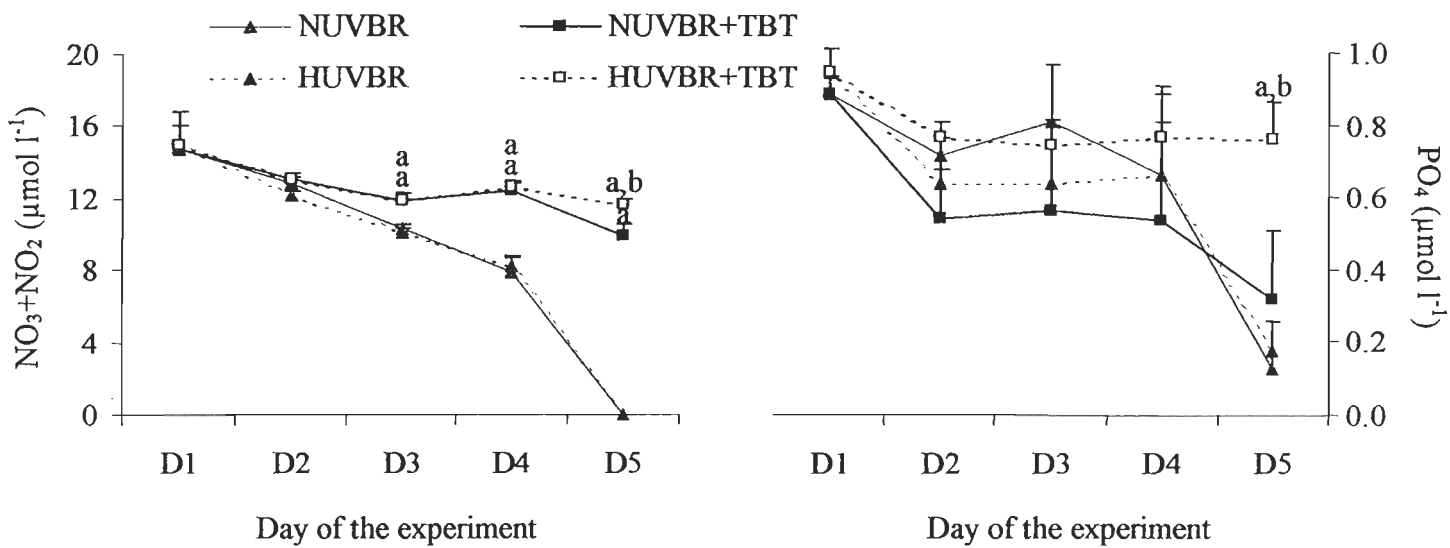
RESULTS

Biochemical parameters

Temporal changes in nutrient concentrations are shown in Fig. 3. A significant decrease of nitrogen concentrations in NUVBR and HUVBR was observed from day 1 to day 5 without significant difference between both treatments (from 14.75 ± 1.27 to $0.01 \pm 0.00 \mu\text{mol l}^{-1}$, and from $14.95 \pm 1.92 \mu\text{mol l}^{-1}$ to $0.01 \pm 0.00 \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively). Significant differences in nitrogen concentrations were recorded from day 3 to day 5 between both NUVBR+TBT and HUVBR+TBT treatments compared to NUVBR treatment. Moreover, differences between both NUVBR+TBT and HUVBR+TBT became significant at the end of the experiment (9.93 ± 0.60 and $11.67 \pm 0.27 \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively) with a significant interaction between TBT and UVBR ($F_{1,6} = 21$; $**P < 0.01$). Decreases in phosphate concentrations were observed throughout the experiment for all treatments excepted for HUVBR+TBT, where final value ($0.76 \pm 0.10 \mu\text{mol l}^{-1}$) was significantly higher than for all other treatments (0.13 ± 0.10 , 0.32 ± 0.19 and $0.18 \pm 0.04 \mu\text{mol l}^{-1}$ for NUVBR, NUVBR+TBT and HUVBR, respectively), with a significant interaction between TBT and UVBR ($F_{1,6} = 7$; $*P < 0.05$).

Figure 3. Temporal changes in (A) nitrate+nitrite, and (B) phosphate concentrations.

^aSignificant differences between natural conditions and TBT-added treatments, and ^{a,b}significant differences between NUVBR+TBT and HUVBR+TBT treatments. (Means \pm SD).



Chl *a* concentrations and in vivo fluorescence

The effect of TBT addition on Chl *a* concentrations is illustrated in Fig. 4. A steady decrease is observed for TBT-added treatments, from 0.88 $\mu\text{g l}^{-1}$ to 0.67 and 0.35 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively for NUVBR+TBT and HUVBR+TBT, whereas Chl *a* concentrations increased in TBT-free treatments to reach final values of 54.71 $\mu\text{g l}^{-1}$ (NUVBR) and 48.00 $\mu\text{g l}^{-1}$ (HUVBR) without significant difference between them. The inhibitory effect induced by TBT addition was significant (** $P < 0.01$) as it started from day 2 and was maintained until the end of the experiment (*** $P < 0.001$). This toxicity resulted in Chl *a* values never exceeding 1 $\mu\text{g l}^{-1}$, and representing 1.13 % (± 0.85) and 0.6 % (± 0.32) of NUVBR final value for NUVBR+TBT and HUVBR+TBT, respectively.

Regarding photoinhibition of PS II, no differences between F_v/F_m values were observed in the first two days after TBT addition. On day 3, NUVBR+TBT ($P = 0.03$) and HUVBR+TBT ($P = 0.021$) exhibited significant lower values of F_v/F_m than those corresponding to the NUVBR treatment with 73 (± 27) and 90% (± 0) of inhibition, respectively (Table 3). Moreover, photoinhibition was significantly higher for HUVBR+TBT than for NUVBR+TBT ($*P < 0.05$). Thereafter, TBT-added treatments did not show a fluorescence signal above background (days 4 and 5). Enhanced UVBR effect alone was only observed by the end of the experiment when the final F_v/F_m value in HUVBR treatment represented 52% of the final value in NUVBR treatment.

Figure 4. Temporal changes in Chl *a* concentrations, as % decrease relative to natural conditions. *Significant differences between treatments and relative to NUVBR. (Means \pm SD).

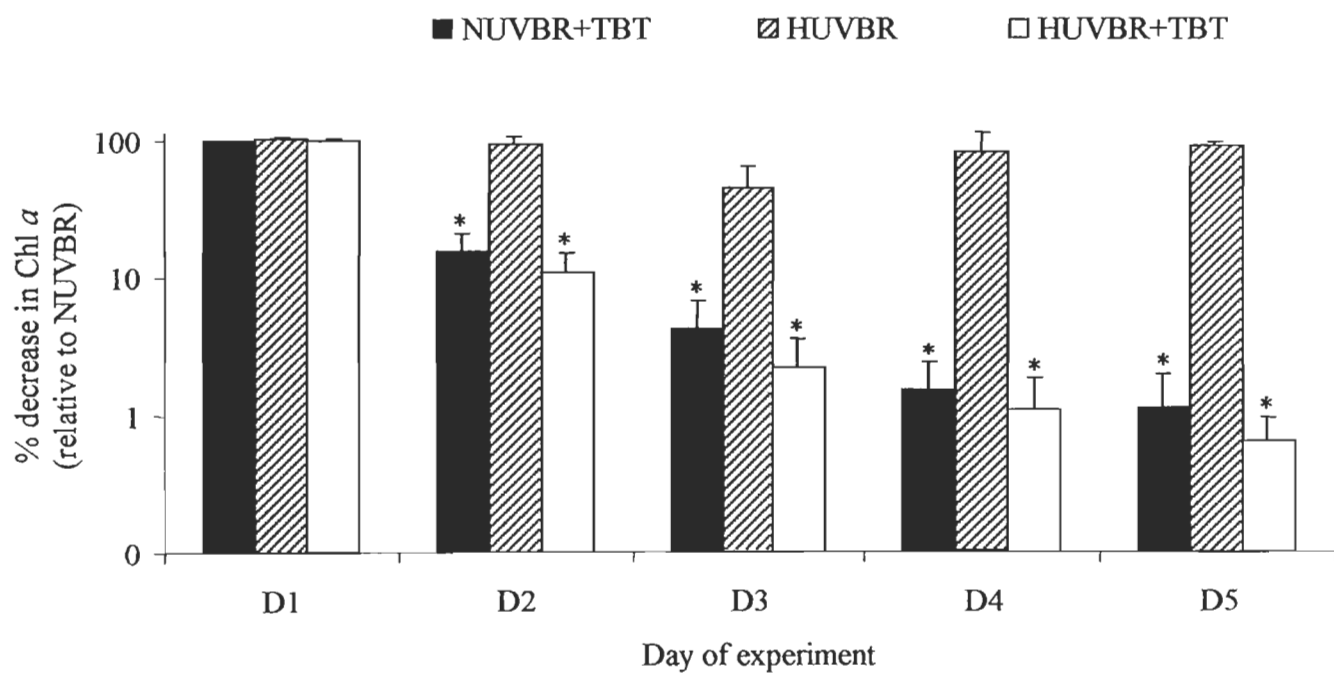


Table 3. Photochemical yield values, expressed as % relative to NUVBR treatment, and calculated from the fluorescence ratio parameters $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. (Means \pm SD). *significant differences ($P < 0.05$) with NUVBR. **significant difference ($P < 0.05$) between NUVBR+TBT and HUVBR+TBT. n.s.: no fluorescence signal recorded.

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
NUVBR+TBT	100 (\pm 0)	132 (\pm 53)	27 (\pm 2)*	n.s.	n.s.
HUVBR	102 (\pm 32)	128 (\pm 28)	83 (\pm 23)	97 (\pm 8)	52 (\pm 9)*
HUVBR+TBT	120 (\pm 3)	107 (\pm 25)	10 (\pm 0)**	n.s.	n.s.

Phytoplanktonic abundances, cellular characteristics and growth rates

As expected from the increased Chl *a* concentrations in NUVBR, an apparent increase in total abundance of phytoplankton <20 μm was observed from day 1 (1416 ± 435 cell ml^{-1}) to day 5 (31846 ± 312 cell ml^{-1}). In the absence of TBT addition, enhanced UVBR alone resulted in a significant lower total abundance of phytoplankton <20 μm with a final value of 12853 ± 1797 cell ml^{-1} (i.e. 40% of the NUVBR value) (Fig. 5). On the other hand, and following TBT addition, total abundance of phytoplankton <20 μm has never increased in NUVBR+TBT nor in HUVBR+TBT. Significant decreases ($*P < 0.05$) were recorded only 8 h after TBT addition and became significantly different ($***P < 0.001$) from natural condition thereafter and until the end of the experiment (Fig. 5). During the last two days of the experiment, significant interactions between TBT and UVBR ($F_{1,6} = 190$; $***P < 0.001$ on day 5) were also observed, with final values of 591 ± 35 cell ml^{-1} and 182 ± 90 cell ml^{-1} in NUVBR+TBT and HUVBR+TBT treatments, respectively.

Flow cytometric signatures and analysis allows distinguishing two dominant size fractions of phytoplankton from the natural assemblage: 1-3 μm cells (referred as the small fraction) and 3-10 μm cells (referred as the large fraction). Changes in cellular characteristics (FSC and SSC indices) of these two fractions after TBT addition are shown in Fig. 6. Under natural and enhanced UVBR conditions, both fractions were characterized by a diel periodicity in FSC values. When TBT was added, cell size (FSC values) of the

small fraction did not exhibit large differences from NUVBR (Fig. 6A), whereas the large fraction exhibited a significantly higher cell size, after 24 h exposure for both TBT-added treatments (** $P < 0.01$) (Fig. 6B). SSC values of the small fraction (related to the shape of the cells) were significantly higher under TBT-added treatments than NUVBR by the end of the experiment ($P < 0.05$) (Fig. 6C), whereas the large fraction exhibited the highest SSC values from day 1 pm for HUVBR+TBT ($P < 0.05$) and day 2 am for NUVBR+TBT ($P < 0.05$), and until the end of the experiment (*** $P < 0.001$ on day 4 pm) (Fig. 6D). As a result of increase in FSC and SSC values, growth rates of both cell fractions were significantly and negatively affected by TBT (Fig. 7), with the larger fraction being more affected than the small one, but without significant differences between both TBT-added treatments. No significant differences were observed between NUVBR and HUVBR treatments.

Figure 5. % decrease in total abundance of phytoplankton cells <20 μm relative to NUVBR treatment. ^aSignificant differences between treatments and relative to natural conditions, and ^{a,b}significant differences between NUVBR+TBT and HUVBR+TBT treatments. (Means \pm SD).

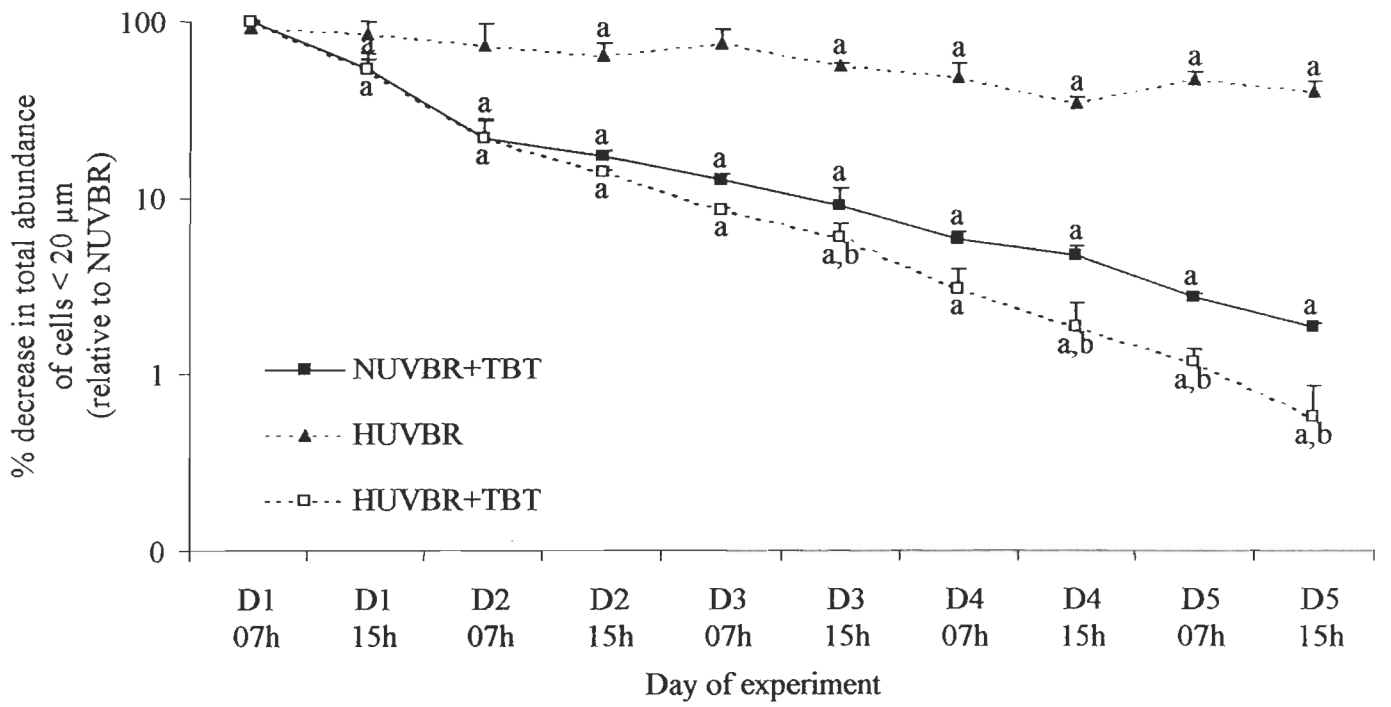


Figure 6. Temporal changes in FSC (as cell size) of (A) 1-3 μm cells, and (B) 3-10 μm cells, and temporal changes in SSC (as cell shape) of (C) 1-3 μm cells, and (D) 3-10 μm cells. *Significant differences between treatments and relative to natural conditions. (Means \pm SD).

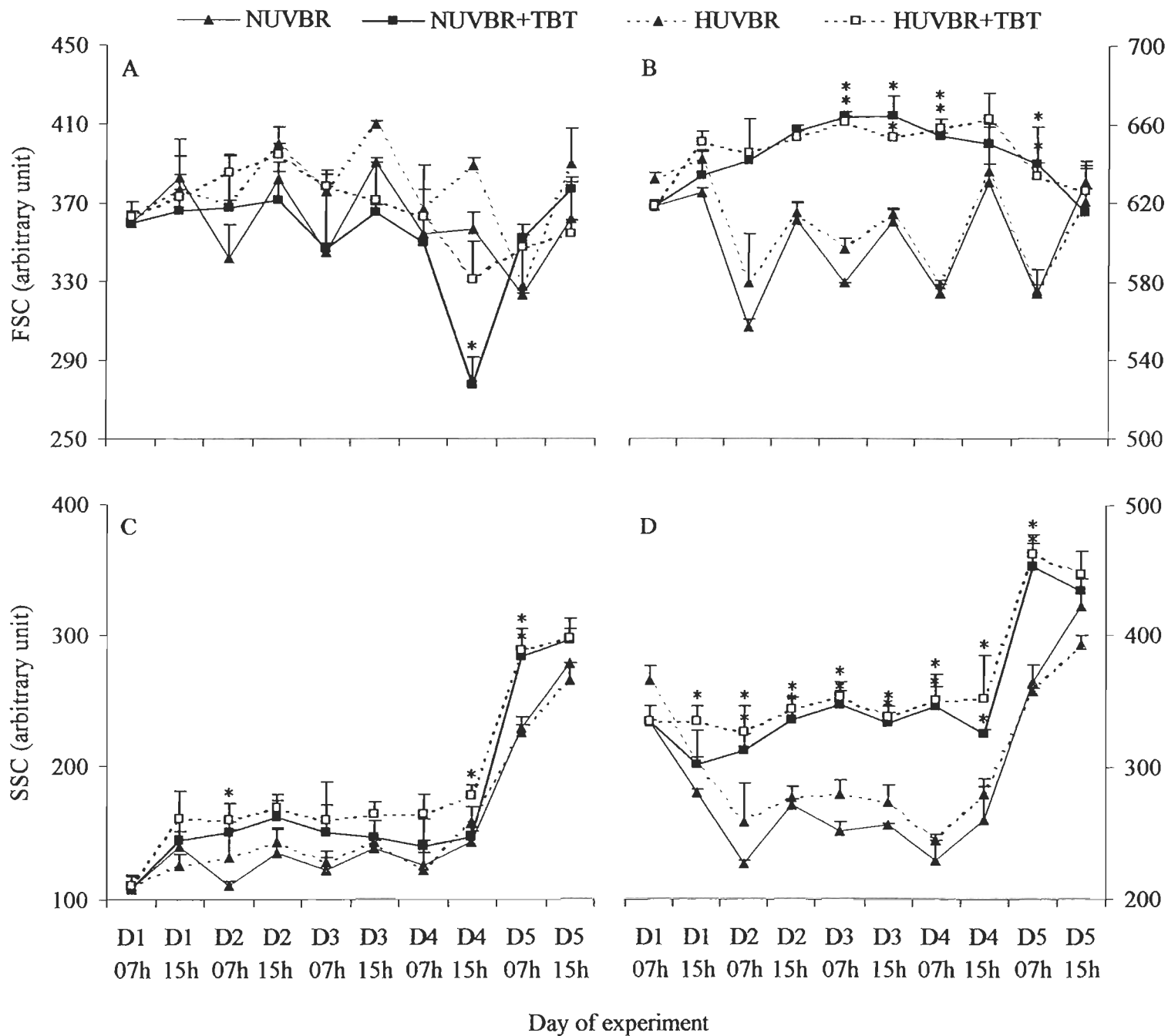
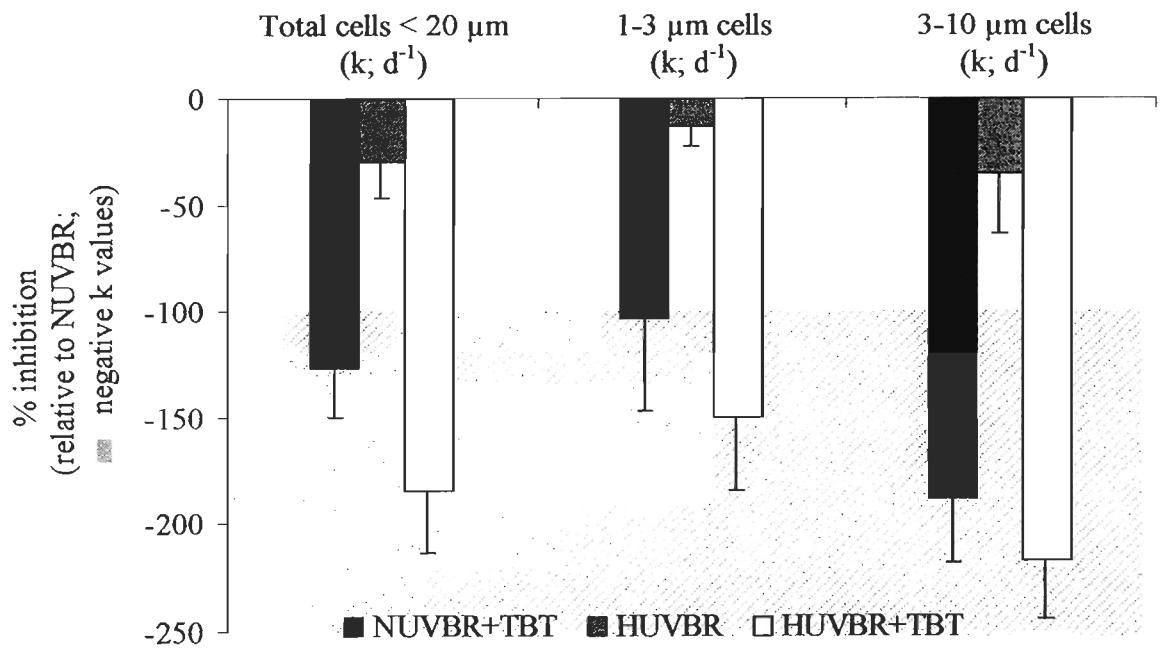


Figure 7. % inhibition of growth rates ($k; d^{-1}$) of phytoplankton cells $<20 \mu\text{m}$, $1-3 \mu\text{m}$ and $3-10 \mu\text{m}$ cells, relative to natural conditions (Means \pm SD), and calculated between day 1 a.m. and day 5 p.m..

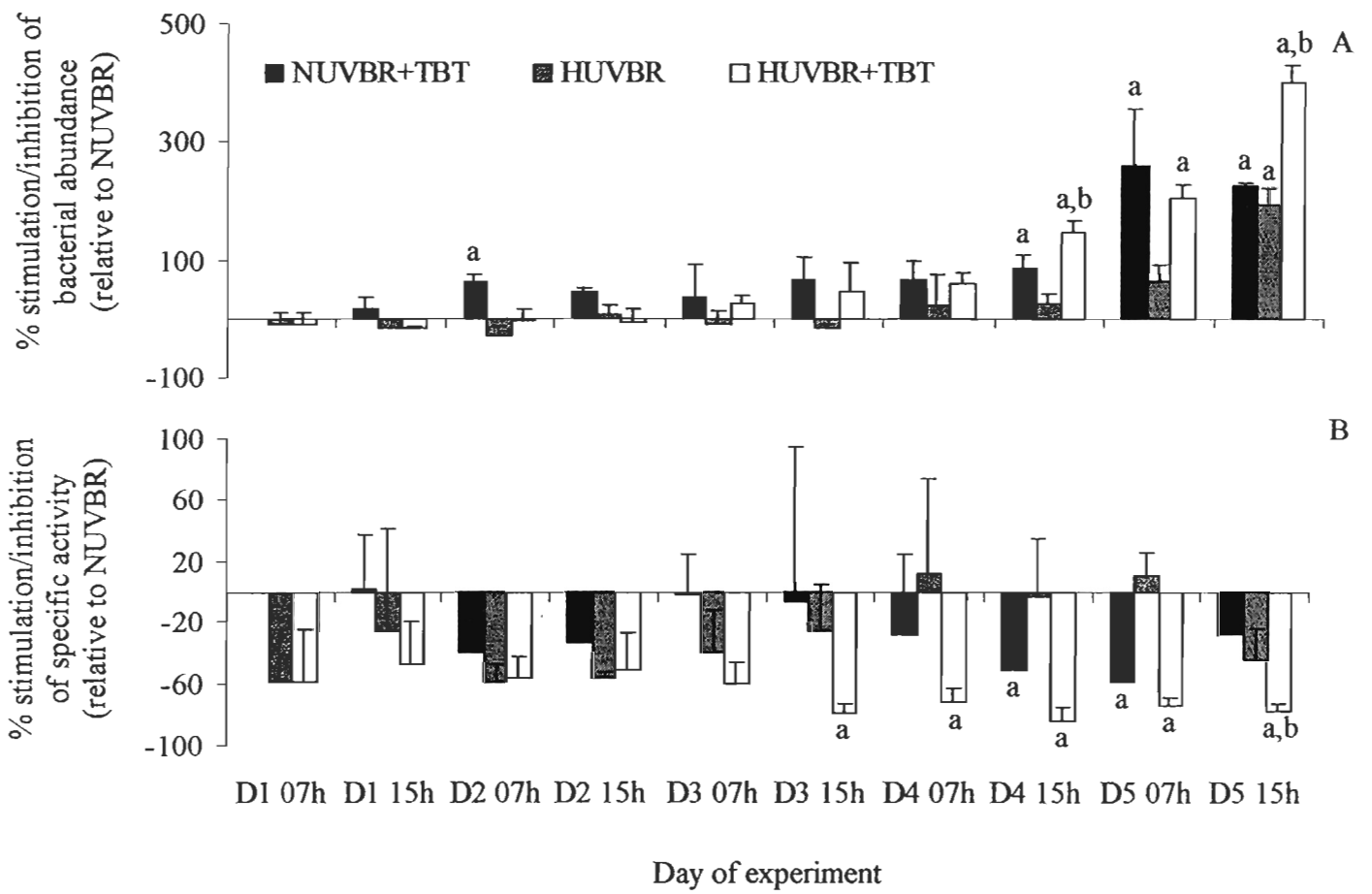


Bacterial abundance and productivity

The overall effect of added TBT was an apparent stimulation of bacterial abundance (Fig. 8A). From day 4 pm to the end of the experiment, bacterial abundances in the TBT-added treatments showed significant higher values ($***P<0.001$) compared to natural conditions without TBT. Enhanced UVBR alone also resulted in a final bacterial abundance higher compared to NUVBR treatment (3.41×10^6 cell ml⁻¹, + 193% (± 30) relative to NUVBR). Moreover, significant interactions ($F_{1,6}= 10$; $*P<0.05$) between TBT and UVBR were observed on day 4 pm and day 5 pm. Final values on day 5 pm were higher in HUVBR+TBT (5.84×10^6 cell ml⁻¹; + 403% (± 29) relative to NUVBR) than in NUVBR+TBT (3.78×10^6 cell ml⁻¹; + 226% (± 6), relative to NUVBR). However, regarding their specific activity and relative to NUVBR, the overall effect of TBT addition was an inhibition in both TBT added-treatments (Fig. 8B). Significant differences from natural conditions appeared on day 3 pm and day 4 pm for HUVBR+TBT treatment ($**P<0.01$), and thereafter on day 4 pm and day 5 am for both NUVBR+TBT and HUVBR+TBT treatments ($**P<0.01$). Moreover, by the end of the experiment, SA value in HUVBR treatment was 2.58×10^{-6} pmol TdR cell⁻¹ h⁻¹, representing ca 54% inhibition, relative to NUVBR. On the afternoon of the last day, a significant interaction ($F_{1,6}= 9$; $*P<0.05$) between TBT and UVBR was observed with final values of 3.16×10^{-6} and 1.08×10^{-6} pmol TdR cell⁻¹ h⁻¹ in NUVBR+TBT and HUVBR+TBT treatments, respectively.

Relative to NUVBR on day 5 (4.70×10^{-6} pmol TdR cell⁻¹ h⁻¹), % inhibitions were 32 % (± 22) and 77% (± 5) for NUVBR+TBT and HUVBR+TBT, respectively.

Figure 8. % stimulation or inhibition of (A) bacterial abundance, and (B) bacterial specific activity. ^aSignificant differences between treatments and natural conditions, and ^{a,b}significant differences ($p < 0.05$) between NUVBR+TBT and HUVBR+TBT treatments. (Means \pm SD).



DISCUSSION

Our exhaustive review of the literature indicated that combined effects of TBT and UVBR in aquatic environments have not been previously reported although TBT has long been the object of a sustained interest from marine toxicologists (de Mora, 1996) and considerable attention was paid to the impact of UVBR in these ecosystems during the past 10 years. The combined effects of TBT and UVBR on a planktonic assemblage could be significant, especially in coastal waters and estuaries because of existing moderate to high TBT concentrations (de Mora, 1996) and non negligible UVBR irradiance (Vincent & Roy, 1993) in these aquatic environments. As recently stated by Hopkins et al. (2004) experimental microcosms allow to capture some of the complexity of the natural systems (here the natural planktonic assemblage directly sampled in coastal waters) while controlling some factors such as light intensity and the nature of toxicants over a short period of exposure to avoid severe container effects (Hopkins et al. 2004). Therefore, the microcosm approach used in the present study provided an effective tool to highlight the extreme sensitivity of a natural planktonic assemblage including heterotrophic bacteria to TBT and our study reports the first evidence that sensitivity of both phytoplankton and bacteria to TBT can be significantly increased by enhanced UVBR, or reciprocally that sensitivity to UVBR can be increased by TBT contamination.

Magnification of TBT phytotoxicity under UVBR exposure

The present study confirms that TBT exerts inhibitory effects on almost all biological parameters considered here, and these inhibitory effects increased strongly when TBT addition occurred simultaneously with increased UVBR exposure. Indeed, the hypothesis that an interaction between TBT and UVBR could increase TBT or UVBR sensitivity is confirmed by observing the significant differences and interactions between NUVBR+TBT and HUVBR+TBT treatments for several investigated parameters such as nutrient concentrations, photochemical yield, abundance of cells $<20 \mu\text{m}$, and finally bacterial abundance and production.

Observed changes in photochemical yield (F_v/F_m) indicate significant damages to the photosynthetic apparatus in both TBT-added treatments, with or without HUVBR exposure. The lipophilic character of TBT allows this compound to penetrate thylakoid membrane where it can act as a proton carrier, inhibiting photophosphorylation (ATP synthesis) (Huang et al., 1996). ATP is synthesized throughout an ATPase (CF_0 and CF_1 proteins) and is coupled to the H^+ gradient established across the thylakoid membrane by the light reactions of the photosynthesis (Fig. 9A). It was suggested that a major ATPase site of TBT action is the CF_0 segment of the CF_0CF_1 -ATPase complex (Schreiber & Rienits, 1987). TBT may have affected ATP synthesis by modifying the CF_0 structure (Bertoli et al., 2001) with subsequent generation of free radicals (Fig. 9B). Consequently, we hypothesize that TBT added in microcosms induced a negative feedback on photosynthetic electron transport and ultimately damaged PS II reaction centers of the cells,

as suggested by the observed reduction in F_v/F_m values. Such F_v/F_m reduction following TBT contamination was more pronounced for cells co-exposed to enhanced UVBR level (HUVBR+TBT) which implies that HUVBR also induced photosynthetic damages (Table 3). The primary site of UVBR-induced damages appear to be also PS II with decreased size and density, via reactive oxygen species (ROS) generated by photosensitization and damage to the D1 protein of the PS II (Vernet, 2000). The significant interaction between TBT and UVBR observed on day 3 could therefore be attributed to a higher sensitivity to dual stresses, with two different action modes and/or to a synergistic actions due to free radical formation that reduce O_2 to $O_2^{\cdot-}$ ions with a subsequent formation of ROS that destroy photosynthetic membranes by peroxidation (Girotti, 2001) (Fig. 9B). Such synergistic inhibition of the photosynthetic apparatus observed on day 3 under combined stresses could be due to an altered membrane permeability brought about by the peroxidation of membrane lipids following TBT contamination. This could therefore increase phytoplanktonic sensitivity and UVBR-induced photosynthetic damages.

The fact that no more signal of fluorescence was recorded during the last two days of the experiment for NUVBR+TBT and HUVBR+TBT treatments implies that cells were in poor physiological state, with no more discernable interactions between TBT and UVBR effects on photosynthetic apparatus. Nitrogen cellular transport into the cell is tightly coupled to an active transport requiring ATP energy (Falkowski & Raven, 1997) (Fig. 9A). TBT inhibition of photophosphorylation, and the resulting slowing down of ATP synthesis and inhibition of $ATP \rightleftharpoons P_i$ exchange activities (Fig. 9B) can explain the high external

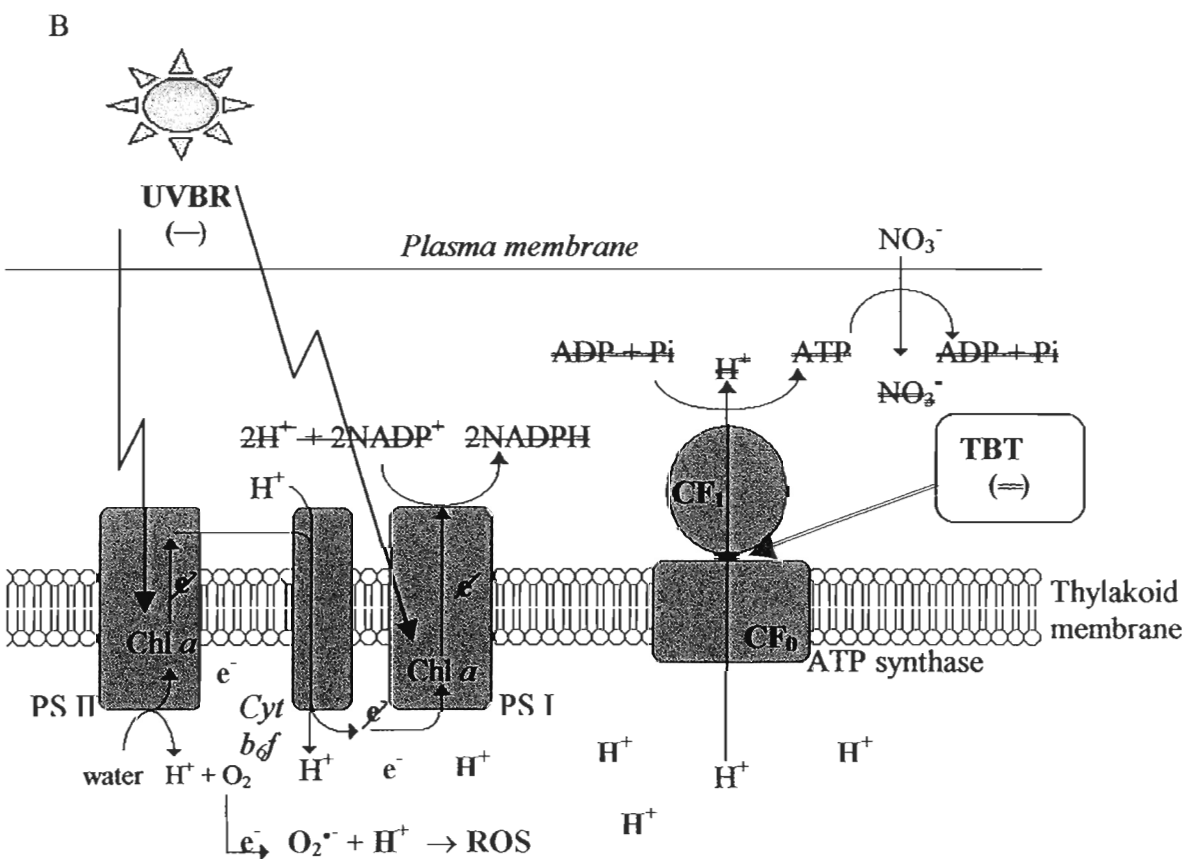
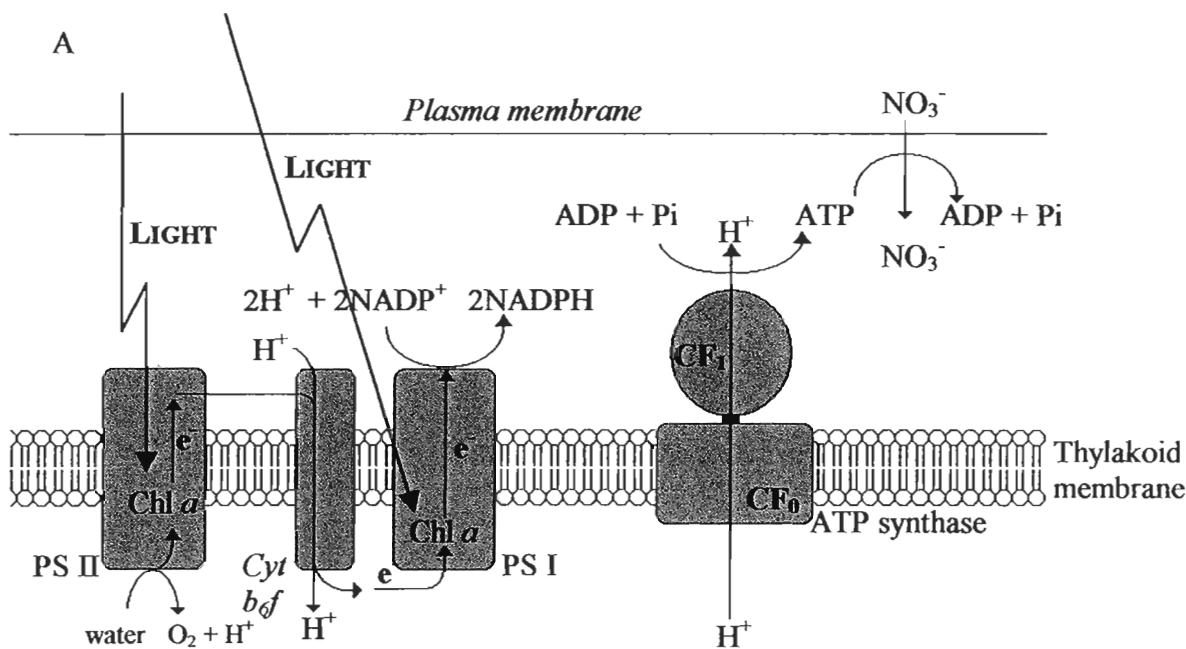
nitrogen concentrations remaining in NUVBR+TBT by the end of the experiment. Following the inhibition of photophosphorylation in presence of TBT, phytoplanktonic cells were therefore nutrient-limited and more susceptible to UVBR damages due to the impaired synthesis or repair of photosynthetic proteins (Döhler, 1985; Bothwell et al., 1993; Bergmann et al., 2002). This is supported by the significant difference observed for nitrogen and phosphorus concentrations on day 5 between NUVBR+TBT and HUVBR+TBT, underlying synergistic effects at the cellular level.

Either the effects on photosynthetic apparatus or the effects on nutritional status, give as a result a significant cellular catabolism from the co-occurrence of TBT and enhanced UVBR (Fig. 5). Results of cytometric analysis clearly showed that cell sizes were greatly affected by TBT addition. Huang et al. (1996) assessed submicrostructures of two green algae following TBT exposure. They reported cells unusually large, with inhibition of the cell division and death. The significant higher values of FSC and SSC observed for TBT-added treatments corroborated these results. On one hand, the diel periodicity recorded under natural conditions (NUVBR) is consistent with the accumulation of carbon through photosynthesis following by cell division, producing smaller cells that scatter less during the nighttime (DuRand & Olson, 1998). On the other hand, the absence of this periodicity for TBT-added treatments (with higher cell size) means that cells were not dividing which resulted in more deleterious negative effects on apparent growth rates, especially for large cells (i.e. 3-10 μm) (Fig. 7).

UVBR can also induce an increase in cell size and reduction in growth rate (Behrenfeld et al., 1992; Buma et al., 1996; Mostajir et al., 1999b) with photosensitized

oxidation of DNA bases via proteins and other cellular components. Such DNA damages result in an inhibition of DNA replication that is a pre-condition for cell division (Buma et al., 1996). With the co-occurrence of TBT and enhanced UVBR (HUVBR+TBT treatment), growth rates of small and large cells represented 135 and 165% inhibition relative to NUVBR, respectively. Such values represented 38 and 10% more inhibition than for TBT-exposed cells alone, respectively for the small and large fractions, underlying that the synergistic effects of TBT and UVBR on photosynthesis and/or nutritional status of phytoplanktonic cells were responsible for these more pronounced growth rate inhibition in HUVBR+TBT treatment. Therefore, all of these negative impacts on physiological endpoints (i.e. photosynthesis, reduction of cell division cycle and growth rates) resulted in a reduced abundance of phytoplankton <20 μm .

Figure 9. (A) Schematic view of the thylakoid membrane integrity representing photosystem II (PS II), cytochrome *b₆f* (cyt *b₆f*), and photosystem I (PS I) (Adapted from Flakowski & Raven, 1997). The path of the electrons from H₂O to NADPH is indicated, as well as the proton transport throughout the ATP synthase, and (B) negative actions of TBT (≡) and UVBR (—) on this thylakoid membrane. (see text for explanation).



Direct and indirect feedbacks on bacterioplankton

Bacterial interactions with TBT are important because bacteria may play a significant role in the environmental transformation of tin compounds, and in bioremediation of contaminated sites (White et al., 1999). After TBT addition (NUVBR+TBT treatment), bacterial abundance showed an overall stimulation by the end of the experiment, suggesting the presence of an additional available carbon source. Indeed, some bacterial strains can metabolically use TBT as a carbon source (Blair et al. 1982; Fukagawa et al., 1994). Moreover, exudates and cells lysis from TBT-stressed phytoplankton could also contribute to the increase in bacterial available carbon, as Mouhri et al (1995) demonstrated that exposition of phytoplankton TBT resulted in mucilaginous excretion. Addition of TBT under enhanced UVBR levels accentuated this increasing bacterial abundance. As UVBR-induced photoinhibition is also known to increase organic matter exudation from phytoplanktonic cells (Malinsky-Rushansky & Legrand, 1996), this can explain the higher bacterial abundance under HUVBR+TBT treatment than under NUVBR+TBT treatment by the end of the experiment, and the significant interaction between both stresses on bacterioplankton.

However, same TBT inhibitory mechanisms, previously illustrated for chloroplasts, can be active on bacteria (Dubey & Roy, 2003). As a result of all or a number of these different mechanisms, we observed that specific bacterial activity (SA) exhibited an overall inhibition of 28% due to TBT addition, and this inhibition was significantly much more higher in UVBR enhancement treatment (HUVBR+TBT treatment: 77%), with a

significant interaction between both stresses. Indeed, many studies demonstrated that DNA was one of the main targets of UVBR with formation of thymidine dimers, resulting in reduction in bacterial production (Aas et al., 1996; Jeffrey et al., 1996; Visser et al., 1999; Boelen et al., 2002). Therefore, synergistic deleterious effects occurred and contributed to the more important decline in bacterial production observed under HUVBR+TBT treatment than under NUVBR+TBT treatment.

CONCLUSIONS

This study records the first results on the toxic effects of TBT under enhanced UVBR levels on a natural planktonic assemblage using a microcosm approach. Results demonstrate a fast and drastic effect of TBT on phytoplankton cells. Deleterious effects following TBT contamination were significantly more pronounced when cells are co-exposed to enhanced UVBR levels. Phytoplankton cells were affected in their physiological functions (i.e. photosynthetic efficiency and cell division) with subsequent decrease in apparent growth rate and increase in cell size. Although a stimulation was observed for bacterial abundance, bacterial production was reduced by TBT toxicity and the co-occurrence of both stresses increased these negative effects.

The synergistic mechanism of TBT and UVBR effects could imply either an UVBR increase of the TBT sensitivity or a TBT increase of the UVBR sensitivity of the natural

planktonic assemblage, but defining the exact synergistic mechanism was beyond of the scope of this study. However, it is evident that both environmental stresses acted together to induce ultimate negative effects reflected in the continuously decreasing total abundance of phytoplankton cells $<20 \mu\text{m}$, as well as in the inhibition of the bacterial production. These results contribute to the understanding of environmental factors (i.e. light environment) that can influence sensitivity of planktonic assemblages to anthropogenic-induced stresses. Indeed future ozone loss and subsequent overcoming UVBR stress may shift essential metabolic functions in marine ecosystems, with trophic consequences *via* energy loss to the ecosystem, and changes in the relative proportions of the heterotrophic and autotrophic components of the microbial food web, as previously shown by Mostajir et al. (1999a).

Acknowledgements

This work was supported by a National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant and by the Fonds FQRNT of Québec to S.D. and E.P.. It is a contribution to an international research program of Inter American Institut for Global Change Research (IAI). We would like to acknowledge Drs S. Diaz, S. Roy and B. Klein for providing radiation data, and K. Chatila and K. Lacoste for their assistance in experimental work. This study is a contribution to the Institut des Sciences de la Mer de Rimouski (ISMER) and Québec-Océan network.

REFERENCES

- Aas, P., Lyons, M.M., Pledger, R., Mitchell, D.L., Jeffrey, W.H., 1996. Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquat. Microb. Ecol.* 11, 229-238.
- Behrenfeld, M.J., Hardy, J.T., Lee II, H., 1992. Chronic effects of ultraviolet-B radiation on growth and cell volume of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 28, 757-760.
- Bergmann, T., Richardson, T.L., Paerl, H.W., Pinckney, J-L., Schofield, O., 2002. Synergy of light and nutrients on the photosynthetic efficiency of phytoplankton populations from the Neuse River Estuary, North Carolina. *J. Plankton Res.* 24, 923-933.
- Bertoli, E., Ambrosini, A., Zolese, G., Gabbianelli, R., Fedeli, D., Falcioni, G., 2001. Biomembrane perturbation induced by xenobiotics in model and living systems. *Cell Biol. Mol. Lett.* 6, 334-339.
- Blair, W.R., Olson, G.J., Brinckman, F.E., Iverson, W.P., 1982. Accumulation and fate of tri-*n*-butyltin cation in estuarine bacteria. *Microbiol. Ecol.* 8, 241-251.
- Blunden, S.J., Chapman, A.H., 1982. The environmental degradation of organotin compounds - a review. *Environ. Technol. Lett.* 3, 267-272.

- Bothwell, M.L., Sherbot, D., Roberge, A.C., Daley, R.J., 1993. Influence of natural ultraviolet radiation on lotic diatom community growth, biomass accrual, and species composition: short-term versus long-term effects. *J. Phycol.* 29, 24-35.
- Buma, A.G.J., Van Hannen, E.J., Roza, L., Veldhuis, M.J.W., Gieskes, W.W.C., 1996. Monitoring ultraviolet-B induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimer detection. *J. Phycol.* 31, 314-321.
- Cabello-Pasini, A., Aguirre-von-Wobeser, E., Figuero, F.L., 2000. Photoinhibition of photosynthesis in *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae), *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and *Ulva lactuca* (Chlorophyceae) in outdoor culture systems. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 57, 169-178.
- Champ, M.A., Pugh, W.L., 1987. Tributyltin antifouling paints: introduction & Overview. OCEAN'87 organot, Symp. 1296-1308 .
- Chatila, K., Demers, S., Mostajir, B., Gosselin, M., Chanut, J-P., Monfort, P., Bird, D., 2001. The responses of a natural bacterioplankton community to different levels of ultraviolet-B radiation: a food web perspective. *Microb. Ecol.* 41, 56-68.
- Cooney, J.J., Wuertz, S., 1989. Toxic effects of tin compounds on microorganisms. *J. Ind. Microbiol.* 4, 375-402.
- Davidson, A., Belbin, L., 2002. Exposure of natural Antarctic marine microbial assemblages to ambient UV radiation: effects on the marine microbial community. *Aquat. Microb. Ecol.* 27, 159-174.
- De Mora, S.J., 1996. Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant. Cambridge University Press, New York.

- Döhler, G., 1985. Effect of UV-B radiation (290-320 nm) on the nitrogen metabolism of several marine diatoms. *J. Plant. Physiol.* 118, 391-400.
- Dubey, S.K., Roy, U., 2003. Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *Appl. Organomet. Chem.* 17, 3-8.
- Duquesne, S., Liess, M., 2003. Increased sensitivity of the macroinvertebrate *Paramoera walkeri* to heavy-metal contamination in the presence of solar UV radiation in Antarctic shoreline waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 255, 183-191.
- DuRand, M., Olson, R.J., 1998. Diel patterns in optical properties of the chlorophyte *Nanochloris* sp.: Relating individual-cell to bulk measurements. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1107-1118.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 1997. Aquatic photosynthesis. Blackwell Science.
- Fauchot, J., Gosselin, M., Levasseur, M., Mostajir, B., Belzile, C., Demers, S., Roy, S., Villegas, P.Z., 2000. Influence of UV-B radiation on nitrogen utilization by a natural assemblage of phytoplankton. *J. Phycol.* 36, 484-496.
- Fent, K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Toxicol.* 26, 1-117.
- Fukagawa, T., Konno, S., Takama, K., Suzuki, S., 1994. Occurrence of tributyltin (TBT) and methyl mercury tolerant bacteria in natural seawater to which TBT was added. *J. Mar. Biotechnol.* 1, 211-214.
- Fuhrman, J.A., Azam, F., 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66, 109-120.

- Garde, K., Cailliau, C., 2000. The impact of UV-B radiation and different PAR intensities on growth, uptake of ^{14}C , excretion of DOC, cell volume, and pigmentation in the marine prymnesiophyte, *Emiliana huxleyi*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 247, 99-112.
- Girotti, A.W., 2001. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 63, 103-113.
- Hoch, M., 2001. Organotin in the environment – an overview. Appl. Geochem. 16, 719-743.
- Hopkins, W. A., Staub, B. P., Snodgrass, J. W., Taylor, B. E., DeBiase, A. E., Roe J. H., Jackson, B. P., Congdon, J. D., 2004. Responses of benthic fish exposed to contaminant in outdoor microcosms-examining the ecological relevance of previous laboratory toxicity tests. Aquat. Toxicol. 68, 1-12.
- Huang, G., Bai, Z., Dai, S., Xie, Q., 1993. Accumulation and toxic effect of organometallic compounds on algae. Appl. Organometal. Chem. 7, 373-380.
- Huang, G., Dai, S., Sun, H., 1996. Toxic effects of organotin species on algae. Appl. Organomet. Chem. 10, 377-387.
- Jeffrey, W.H.M., Ledger, R.J., Aas, P., Hager, S., Coffin, R.B., Von Haven, R., Mitchell, D.L., 1996. Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. Mar. Ecol. Prog. Ser. 137, 283-291.
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annu. Rev. Plant. Physiol. Biol. 42, 313-349.

- Kuhn, P., Browman, H., McArthur, B., St-Pierre, J-F., 1999. Penetration of ultraviolet radiation in the waters of the estuary and Gulf of St. Lawrence. *Limnol. Oceanogr.* 44, 710-716.
- Lee, R.F., Walkers, A.O., Seligman, P.F., 1989. Importance of macroalgae in the biodegradation of tributyltin estuarine waters. *Environ. Sci. Technol.* 23, 1515-1518.
- Levasseur, M., Therriault, J-C., Legendre, L., 1984. Hierarchical control of phytoplankton succession by physical factors. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 19, 211-222.
- Liess, M., Champeau, O., Riddle, M., Shultz, R., Duquesne, S., 2001. Combined effects of ultraviolet-B radiation and food shortage on the sensitivity of the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* to copper. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2088-2092.
- Maguire, R.J., 2000. Review of the persistence, bioaccumulation and toxicity of tributyltin in aquatic environments in relation to Canada's Toxic Substances Management. *Policy Wat. Qual. Res. J. Can.* 35, 633-679.
- Maguire, R.J., Carey, J.J., Hale, E.J., 1983. Degradation of the tri-n-butyltin species in water. *J. Agric. Food. Chem.* 31, 1060-1065.
- Malinsky-Rushansky, N.Z., Legrand, C., 1996. Excretion of dissolved organic carbon by phytoplankton of different sizes and subsequent bacterial uptake. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 132, 249-255.
- Mallakin, A., McConkey, B.J., Miao, G., McKibben, B., Snieckus, V., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., 1998. Impacts of structural photomodification on the toxicity of environmental contaminants: anthracene photooxidation products. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43, 204-212.

- McConkey, B.J., Duxbury, C.L., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., 1997. Toxicity of PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: effects of phenanthrene and its primary photoproduct, phenanthrenequinone. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 892-899.
- Michel, P., Averty, B., 1999. Distribution and fate of tributyltin in surface and deep waters of the northwestern Mediterranean. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2524-2528.
- Mostajir, B., Demers, S., de Mora, S., Belzile, C., Chanut, J-P., Gosselin, M., Roy, S., Villegas, P.Z., Fauchot, J., Bouchard, J., 1999a. Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation in a planktonic community. *Limnol. Oceanogr.* 44, 586-596.
- Mostajir, B., Sime-Ngando, T., Demers, S., Belzile, C., Roy, S., Gosselin, M., Chanut, J-P., De Mora, S., Fauchot, J., Vidussi, F., Levasseur, M., 1999b. Ecological implications of changes in cell size and photosynthetic capacity of marine *Prymnesiophyceae* induced by ultraviolet-B radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 187, 89-100.
- Mouhri, K., Marsot, P., Pelletier, É., Loudiki, M., Saint-Louis, R., 1995. Effets du chlorure de tributylétain sur la croissance et le métabolisme de la diatomée marine *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin). *Oceanol. Acta.* 18, 363-370.
- Mousseau, L., Gosselin, M., Levasseur, M., Demers, S., Fauchot, J., Roy, S., Villegas, P.Z., Mostajir, B. 2000. Effects of ultraviolet-B radiation on simultaneous carbon and nitrogen transport rates by estuarine phytoplankton during a week-long mesocosm study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 199, 69-81.
- Navio, J.A., Marchena, F.J., Cerrillos, C., 1993. UV photolytic degradation of butyltin chlorides in water. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* 71, 97-102.

- Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, L.M., 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press. Toronto.
- Porter, K.G., Feig, Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-948.
- Reader, S., Pelletier, É., 1992. Biosorption and degradation of butyltin compounds by the marine diatom *Skeletonema costatum* and the associated bacterial community at low temperature. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 599-607.
- Sargian, P., Mostajir, B., Chatila, K., Ferreyra, G. A., Pelletier, É., Demers, S., 2005. Non-synergistic effects of water soluble crude oil and enhanced ultraviolet-B radiation on a natural planktonic assemblage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* In press.
- Scheiner, S.M., Gurevitch, J., 1993. Design and analysis of ecological experiments. Chapman and Hall.
- Schreiber, U., Rienits, K.G., 1987. ATP-induced photochemical quenching of variable chlorophyll fluorescence. *FEB.* 211, 99-104.
- Seligman, P.F., Valkirs, A.O., Lee, R.F., 1986. Degradation of Tributyltin in San Diego Bay, California, Waters. *Environ. Sci. Technol.* 20, 1229-1235.
- Sidharthan, M., Young, K.S., Woul, L.H., Soon, P.K., Shin, H.W., 2002. TBT toxicity on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 177-182.
- Smith, D.C., Azam, F., 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using ^3H -Leucine. *Mar. Microb. Food Webs* 6, 107-114.

- Tam, N.F.Y., Chong, A.M.Y., Wong, Y.S., 2002. removal of tributyltin (TBT) by live and dead microalgal cells. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 362-371.
- Tarasick, D.W., Fioletov, V.E., Wardle, D.I., Kerr, J.B., McArthur, L.J.B., McLinden, C.A., 2003. Climatology and trends of surface UV. *Atmosph. Ocean* 41, 121-138.
- Tsang, C.K., Lau, P.S., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1999. Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chlorella* species. *Environ. Pollut.* 105, 289-297.
- Tsezos, M., Bell, J.P., 1989. Comparison of the biosorption and desorption of hazardous organic pollutants by live and dead biomass. *Wat. Res.* 22, 561-568.
- Vernet, M., 2000. Effects of UV radiation on the physiology and ecology of marine phytoplankton. In: de Mora, S., Demers, S., Vernet, M. (Eds), *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge Environmental Chemistry, University Press, pp. 237-278.
- van Rijssel, M., Buma, A.G.J., 2002. UV radiation induced stress does not affect DMSP synthesis in the marine prymnesiophyte *Emiliania huxleyi*. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 167-174.
- Vincent, W.F., Roy, S., 1993. Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection and recovery. *Environ. Res.* 1, 1-12.
- Visser, P.M., Snelder, E., Kop, A.J., Boelen, P., Buma, A.G.J., van Duyl, F.C., 1999. Effects of UV radiation on DNA photodamage and production in bacterioplankton in the coastal Caribbean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 20, 49-58.
- Watanabe, N., Sakai, S., Takatsuki, H., 1992. Examination for degradation paths of butyltin compounds in natural waters. *Wat. Sci. Tech.* 11, 117-124.

White, J.S., Tobin, J.M., Cooney, J.J., 1999. Organotin compounds and their interactions with microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 45, 541-554.

Wong, P.T., Chau, Y.K., Kramar, O., Bengert, G.A., 1982. Structure-toxicity relationship of tin compounds on algae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 483-188.

DISCUSSION GÉNÉRALE
ET CONCLUSIONS

Les problèmes environnementaux liés à des facteurs à grande échelle (i.e. diminution de la couche d'ozone et augmentation subséquente du RUV-B) ont été jusqu'à présent étudiés de façon indépendante des problèmes de pollution par les contaminants habituellement abordés en toxicologie environnementale. Il n'y a que très peu d'interactions entre ces deux disciplines. Or, les effets isolés de deux phénomènes environnementaux que l'on pourrait qualifier de "perturbateurs" pour l'écosystème considéré, peuvent agir à tous les niveaux d'organisation, depuis les individus jusqu'aux interactions trophiques de l'écosystème, alors que la synergie entre ces deux problèmes pourrait contribuer à accentuer leurs effets respectifs. L'intégration de ces deux disciplines est donc cruciale dans la compréhension de l'impact des changements globaux sur les écosystèmes. En effet, rappelons que dans l'environnement aquatique en particulier, les organismes sont rarement exposés à un seul stress à la fois, que ce dernier soit d'origine naturelle ou anthropique.

Les travaux de cette thèse ont donc cherché à déterminer non seulement l'impact d'une co-exposition RUV-B/hydrocarbures dissous (fraction soluble d'un pétrole brut : WSF) d'une part, et d'une co-exposition RUV-B/TBT d'autre part, sur les premiers maillons du réseau trophique marin (i.e. phyto- et bactérioplancton), mais également à déterminer si ces impacts pouvaient être différents selon l'écosystème considéré, sachant que la sensibilité au RUV-B peut, entre autre, dépendre de l'environnement lumineux antérieur, actuel et à venir pour les premiers maillons du réseau trophique marin.

Ainsi, une première expérience s'est déroulée à Rimouski (Canada, 48,6°N, 68,2°W) et une deuxième a été mise en place à Ushuaia (Argentina, 54,8°S, 68,2°W). Le choix de ces deux sites tient au fait que d'une part, la pointe méridionale de l'Amérique du Sud est soumise depuis quelques années à l'influence du "trou" d'ozone qui se développe chaque printemps au-dessus du continent austral. D'autre part, l'appauvrissement de la couche d'ozone au niveau des régions arctiques, bien que moins enclin à des diminutions aussi importantes que celles observées au-dessus de l'Antarctique, pourrait s'aggraver au cours de prochaines décennies du fait des changements climatiques causés par l'accroissement des concentrations en gaz à effet de serre (Rex et al. 2004) et des probables changements naturels à plus long terme.

Pour ces deux expériences, la même approche en microcosmes a été mise en place. Ainsi, un assemblage planctonique a été prélevé dans le milieu naturel et incubé pendant 5 jours dans des microcosmes exposés à deux conditions de lumière : RUV-B naturel (traitement NUVBR) et RUV-B accru (traitement HUVBR), avec ou sans addition d'hydrocarbures dissous constitués de la fraction soluble d'un pétrole brut (WSF) pour chacun des deux traitements RUV-B (respectivement les traitements NUVBR+WSF et HUVBR+WSF). Aux deux sites, les résultats ont démontré l'impact à court-terme du RUV-B d'une part, et de la WSF d'autre part, sur les premiers maillons du réseau trophique marin. Cependant l'importance relative des effets du RUV-B a été différente selon l'environnement considéré, tout comme l'impact de la contamination par les hydrocarbures dissous, d'où une différence de réaction du système face au double stress RUV-B × WSF.

En effet, l'augmentation du RUV-B n'a pas eu d'effet sur la biomasse totale de l'estuaire du Saint-Laurent telle que mesurée par la concentration en Chl α . Par contre, une diminution de l'abondance des cellules $< 20 \mu\text{m}$ a été observée avec une diminution du taux de croissance plus importante chez les cellules nanophytoplanctoniques. De même, une réduction dans le rendement photochimique du PS II est apparue à la fin de l'expérience (Annexe 1). A l'inverse, aussi bien la biomasse totale de la baie d'Ushuaia que l'abondance des cellules $< 20 \mu\text{m}$ ont été affectées, avec cette fois une diminution du taux de croissance plus importante chez les cellules picophytoplanctoniques. Par contre, et ce malgré une inhibition de presque 50% aux cours des premières heures d'exposition au RUV-B accru, le rendement photochimique du PS II présentait en fin d'expérience des valeurs comparables à celles observées sous des conditions de lumière naturelle.

Plusieurs facteurs peuvent en effet conditionner l'importance des effets du RUV-B sur un assemblage planctonique et ainsi expliquer les différences observées dans nos travaux. En premier lieu, l'état nutritionnel de l'environnement est à considérer. Ainsi, pour l'expérience de Rimouski, les concentrations initiales en éléments nutritifs étaient particulièrement élevées (nitrates $14,15 \mu\text{mol l}^{-1}$; silicates : $19 \mu\text{mol l}^{-1}$), ce qui a permis la floraison, composée principalement de diatomées (i.e. déplétion de silicates en fin d'expérience). Or de précédents travaux ont démontré la plus grande aptitude de ces espèces à faire face au RUV-B (Vernet 2000). Toutefois, cette floraison a conduit à une déplétion des éléments nutritifs dans le milieu et donc à une limitation potentielle des cellules en éléments nutritifs, les rendant alors plus sensibles aux effets du RUV-B. A

l'inverse, l'assemblage planctonique prélevé dans la baie d'Ushuaia était caractérisé par de plus faibles concentrations initiales en éléments nutritifs (nitrates : $5\mu\text{mol l}^{-1}$; silicates $4,3\mu\text{mol l}^{-1}$), dues au fait que cette seconde expérience s'est déroulée juste après la floraison printanière. Il est donc probable dès lors que les grosses cellules étaient minoritaires et/ou en état de sénescence d'où un effet visible du RUV-B sur la biomasse totale.

De plus, une insuffisance nutritionnelle peut également fortement gêner les mécanismes de défense vis à vis du RUV-B car la synthèse des enzymes de réparation et de pigments photoprotecteurs requiert de l'énergie et des éléments nutritifs. Ainsi, et bien que des analyses spécifiques n'ont pas été réalisées pour déterminer leur composition en pigments, il semble peu probable que les cellules phytoplanctoniques de l'estuaire du Saint-Laurent aient été en mesure de synthétiser des composés photoprotecteurs, considérant la réduction du rendement photochimique du PS II en fin d'expérience, en parallèle avec la déplétion en éléments nutritifs dans le milieu. Un autre point permet de supporter cette hypothèse. En effet, le RUV-B ne semble pas avoir influencé de manière significative la taille cellulaire moyenne, et principalement des cellules nanophytoplanctoniques alors que leur taux de croissance présentait une diminution plus importante que celui des cellules picophytoplanctoniques. Or, pour Ushuaia, le rétablissement diurne du rendement photochimique du PS II a pu être attribué à la synthèse de composés photoprotecteurs et ce principalement par les cellules nanophytoplanctoniques, expliquant ainsi l'augmentation de la taille cellulaire de cette fraction phytoplanctonique. Toutefois, cette synthèse de composés photoprotecteurs requiert une demande d'énergie plus importante qui n'est dès

lors plus disponible pour la croissance, ce qui explique la diminution observée du taux de croissance. Par contre, les cellules plus petites (i.e. picophytoplanctoniques) ne sont pas prédisposées à développer de telles stratégies de protection, et semblent quant à elles avoir principalement été sujettes à des dommages à l'ADN, réduisant de manière plus importante leur taux de croissance.

Pour expliquer cette différence de réponse pour le nanophytoplancton et le picophytoplancton entre les deux sites, nous avançons l'hypothèse que dans le cas des organismes de l'estuaire du Saint-Laurent, les cellules nanophytoplanctoniques n'ont pas pu s'adapter au stress RUV-B qui est intervenu en parallèle avec une déplétion en éléments nutritifs, réduisant ainsi leur capacité de photoprotection et par conséquent ont été endommagés aussi bien par une photoinhibition que par des dommages à l'ADN. Par contre dans la baie d'Ushuaia, les cellules nanophytoplanctoniques ont réagi au stress RUV-B en synthétisant des pigments photoprotecteurs et en minimisant ainsi les dommages à l'ADN, alors que les cellules picophytoplanctoniques semblent avoir principalement été sujettes à ces dommages nucléaires.

Il en est de même si l'on considère la réponse du bactérioplancton aux deux sites. Le RUV-B a induit non seulement des effets directs sur le bactérioplancton, mais également des effets indirects en raison des interactions trophiques entre cette composante biologique et le phytoplancton. Ainsi, pour l'estuaire du Saint-Laurent, l'abondance bactérienne a augmenté suite à l'exposition au RUV-B, certainement en partie du à une disponibilité

accrue en substrats de croissance issus des cellules phytoplanctoniques affectées par le RUV-B. Il est également possible que les ciliés ont pu être affectés par le RUV-B ce qui a conduit à une diminution de la pression de prédation sur le bactérioplancton (Mostajir et al. 1999a). Par contre, l'activité bactérienne a démontré une périodicité diurne laissant présumer la présence de dommages à l'ADN et de processus de réparation. Ces résultats laissent supposer l'action du RUV-B au niveau cellulaire et non au niveau de la communauté. Par contre, à Ushuaia on a étudié plus spécifiquement cette communauté. L'absence d'effet du RUV-B sur l'abondance bactérienne laisse croire que ces organismes étaient déjà favorisés dans le milieu en raison de la période considérée (i.e. post-floraison). Par contre, si l'on considère plus avant les différentes fractions identifiées, il apparaît un effet négatif notable du RUV-B sur l'activité des cellules dites à faible teneur en acides nucléiques (bactéries LNA). Toutefois, cette fraction ne participerait que faiblement à l'activité de la communauté prise dans son ensemble.

Considérant maintenant l'effet de la contamination par les hydrocarbures dissous (WSF), on constate que les effets ont été plus ou moins prononcés entre les deux sites et s'expliquent principalement par la différence dans la concentration initiale de la WSF ajoutée (Rimouski : 10 mg l^{-1} ; Ushuaia : 5 mg l^{-1}), issue de deux pétroles aux caractéristiques physico-chimiques différentes, mais spécifiques à chaque site en terme de risque de déversement. Ainsi, l'addition de la WSF s'est avérée dommageable d'une part sur la biomasse totale en raison de la forte susceptibilité des diatomées aux hydrocarbures, et d'autre part sur l'abondance des cellules $< 20 \text{ }\mu\text{m}$. En effet, les hydrocarbures

bioaccumulés peuvent non seulement interférer avec les processus photosynthétiques (i.e. diminution du rendement photochimique du PS II; Annexe 1), mais aussi *via* des effets toxiques directs. La toxicité du naphthalène (principal composé identifié) peut être associée à la conversion de ce composé en naphthoquinones correspondantes ainsi qu'en produits hydroxylés (Bagchi et al. 1998). Ces produits de dégradation peuvent potentiellement bloquer la photosynthèse, et plus particulièrement aux sites où la plastoquinone est utilisée comme accepteur ou donneur d'électrons (Huang et al. 1997a), en raison de leur similarité structurale avec le récepteur de liaison Q_b du PS II. La WSF peut également avoir exercé une toxicité envers les organismes *via* des réactions indirectes de photosensibilisation impliquant la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS), pouvant induire des dommages à l'ADN.

Quels que soient les processus en jeu, l'addition de la WSF n'a toutefois conduit à aucune modification cellulaire structurale (i.e. taille cellulaire) et cela aux deux sites, suggérant une action toxique directe des hydrocarbures ayant conduit à une mort cellulaire. Par contre, les taux de croissance ont été grandement affectés et de manière différente selon le site considéré. Alors que pour l'estuaire du Saint-Laurent le taux de croissance des cellules nanophytoplanctoniques a été beaucoup plus affecté (i.e. ~ 80% d'inhibition) que celui des cellules picophytoplanctoniques (i.e. ~ 38% d'inhibition), dans la baie d'Ushuaia, seules les plus petites cellules ont démontré une diminution de leur taux de croissance (i.e. ~ 22% d'inhibition). L'hypothèse mise en avant pour expliquer cette disparité de réponse s'appuie sur la différence de concentration initiale de la WSF utilisée pour les deux sites, et

probablement sur la différence de composition de la WSF que nous n'avons pas analysée à Ushuaia.

Si l'on considère ensuite la réponse du bactérioplancton à l'ajout de la WSF aux deux sites, des différences apparaissent, à savoir une stimulation de l'abondance bactérienne de l'estuaire du Saint-Laurent que l'on ne retrouve pas pour la composante bactérienne de la baie d'Ushuaia. Pour le premier site, cette augmentation de la biomasse était toutefois associée avec une inhibition de la productivité au cours des premiers jours de l'expérience, alors qu'un schéma inverse semblait se mettre en place par la suite (i.e. diminution de l'abondance et augmentation de la productivité spécifique). Ce résultat permet d'émettre l'hypothèse que la contamination par les hydrocarbures a conduit à un changement dans la composition de l'assemblage bactérien, avec l'établissement d'espèces bactériennes spécialisées dans l'utilisation de ces composés comme source de carbone. Si l'on considère maintenant la baie d'Ushuaia, et bien que la WSF n'a eu aucun effet significatif sur l'abondance bactérienne, il n'en est pas de même si l'on considère les deux sous-populations identifiées, à savoir une stimulation de l'abondance des bactéries LNA, avec en parallèle une abondance croissante de colonies bactériennes formant des unités (CFU). Ainsi, l'hypothèse avancée pour l'estuaire du Saint-Laurent semble se confirmer quant à un changement dans la composition bactérienne spécifique.

De par l'ensemble de ces résultats et de l'interprétation que nous avons pu en tirer, il devient manifeste que la co-exposition RUV-B \times WSF ne peut pas induire le même impact aux deux sites. Notons également que l'assemblage planctonique de l'estuaire du Saint-

Laurent a d'abord été soumis à l'augmentation du RUV-B avant d'être contaminé par les hydrocarbures, alors qu'à Ushuaia l'assemblage fut en premier lieu soumis à la contamination par la WSF pour être ensuite exposé au RUV-B. Ainsi, à Rimouski, la WSF a engendré des effets beaucoup plus marqués que ceux associés à l'augmentation du RUV-B, masquant ainsi les effets délétères de ce stress lumineux et donc toute identification possible d'une quelconque interaction entre les deux stress. En effet, le RUV-B et la WSF présentent des mécanismes de phytotoxicité semblables, affectant en particulier l'appareil photosynthétique, endommageant l'ADN, et conduisant à la formation de ROS biologiquement délétères. Il est également possible dès lors que l'importance des effets de la WSF n'ait pas permis au RUV-B d'agir au niveau des cibles cellulaires déjà fortement affectées par les hydrocarbures. À l'inverse, l'effet plus modéré de la WSF à Ushuaia et l'influence plus importante du RUV-B sur les premiers maillons du réseau trophique ont nettement permis d'identifier une interaction synergique entre les deux stress, avec pour résultante un changement dans la composition spécifique aussi bien phytoplanctonique que bactérienne.

Ces résultats démontrent non seulement la complexité mais également la difficulté à déterminer l'impact de stress multiples dans des milieux aussi hétérogènes que les écosystèmes aquatiques. En effet, un grand nombre de facteurs (et leur variabilité spatio-temporelle associée) influencent et déterminent l'importance des effets du RUV-B et de la WSF sur les écosystèmes aquatiques, tous deux ayant des modes d'action sur la cellule identiques. Ainsi, le niveau nutritionnel du milieu, sa composition spécifique, de même que

son environnement lumineux ont en grande partie conditionné la disparité des résultats obtenus dans cette comparaison des effets combinés du RUVB et de la WSF à deux latitudes différentes. De plus, les mécanismes d'interaction entre RUV-B et WSF font appel à des processus de photomodification et de photosensibilisation, que malheureusement nous n'avons pas pu confirmer ou infirmer de part les limites analytiques imposées par la présente étude. Or, la toxicité de certains contaminants comme le TBT ne semble pas être affectée par de tels processus. Ainsi, il était intéressant, pour un même environnement, de voir l'influence d'un autre contaminant sous une exposition au RUV-B. Dans cette optique, l'assemblage planctonique de l'estuaire du Saint-Laurent qui a fait l'objet de la co-exposition RUV-B/WSF à également été soumis à une co-exposition RUV-B/TBT, et cela selon le même protocole expérimental en microcosmes. Attendu que le RUV-B et le TBT démontrent des mécanismes d'altérations cellulaires opposés (à la différence des hydrocarbures et du RUV-B), les résultats ont démontré une nette interaction entre les deux stress et cela aussi bien sur les cellules phytoplanctoniques que bactériennes. Ces mécanismes d'interaction peuvent aussi bien avoir impliqué une sensibilité au TBT, accrue par l'exposition concomitante au RUV-B, qu'une sensibilité exacerbée vis à vis du RUV-B en raison du fort potentiel phytotoxique du TBT. Il devient dès lors intéressant d'approfondir ces mécanismes pour une meilleure compréhension de l'implication des facteurs environnementaux sur le comportement et la toxicité de ce composé.

L'ensemble de ces résultats ont ainsi une importance particulière dans le contexte de l'étude des stress multiples. De façon générale, nos résultats ont illustré l'utilité de

l'approche en microcosmes pour l'étude des interactions entre RUV-B et contaminants comme base de départ dans le domaine des interactions multiples en écotoxicologie. Il faut noter que jusqu'à présent, la majorité des études visant à démontrer les interactions RUV-B/contaminants, et RUV-B/hydrocarbures en particulier, s'est principalement axée sur des composés bien précis, à des concentrations bien plus élevées que celles rencontrées dans l'environnement naturel. De plus, ces études se sont concentrées sur des organismes bien spécifiques par souci de réduire la complexité du problème (McDonald & Chapman 2002). De ce fait, ces études fournissent peu d'information sur la réaction de l'écosystème aux stress multiples, surtout si l'on considère, rappelons le, que les organismes sont rarement exposés à un seul stress à la fois, que ce dernier soit d'origine naturelle ou anthropique. En outre, les recherches réalisées au cours de ce doctorat ouvrent de nombreuses perspectives pour la poursuite de travaux sur les effets du RUV-B et leur interaction avec les pollutions anthropiques croissantes que subissent les écosystèmes aquatiques, et en particulier si l'on considère que certains modèles prédisent une amplification du phénomène de déplétion d'ozone aux hautes latitudes et en particulier dans l'hémisphère Nord en raison du réchauffement climatique.

PERSPECTIVES ET PORTÉE DU TRAVAIL

De nombreux points demandent encore à être explorés et concernent en premier lieu l'aspect purement chimique. En effet, au cours de ces travaux, l'établissement d'une

toxicité photoinduite de la WSF n'a pas pu être confirmée ou infirmée, en raison du protocole analytique utilisé. Néanmoins, rappelons que cette phototoxicité fait suite non seulement à des processus de photosensibilisation, mais également à des processus de photomodification, avec la formation de photoproduits structurellement différents et plus toxiques que leurs composés originels. Des études antérieures ont démontré que l'impact du RUV pouvait conduire à la formation d'une vingtaine de photoproduits, et cela à partir d'un seul composé, d'où la difficulté si l'on considère que la WSF se compose d'une variété de composés pouvant donner lieu à un mélange complexe et difficilement identifiable de photoproduits. Il serait donc intéressant d'approfondir cet aspect afin de déterminer au mieux les changements induits par le RUV-B sur la WSF et leur impact dans l'environnement aquatique. De même, il serait intéressant d'explorer cette voie pour le TBT. En effet, aucune étude à ce jour n'avait considéré l'influence mutuelle entre le RUV-B et la phytotoxicité de ce composé. Alors que le RUV-B peut contribuer de manière significative dans la dégradation du TBT, et cela dans le contexte général d'une diminution de la couche d'ozone, quels peuvent être les métabolites issus de cette photodégradation, et plus particulièrement leur importance en terme de toxicité ? En effet, il se peut que l'action du RUV-B dans la dégradation du TBT agisse différemment sur cette molécule par rapport à l'action biologique.

D'autres perspectives pourraient être envisagées pour approfondir nos connaissances sur l'impact de ces stress multiples sur les premiers maillons du réseau trophique marin et concernent les aspects biologiques et écologiques. Ainsi, l'importance de la pression de

prédation n'a pas été prise en compte dans ces travaux, principalement en raison de contraintes expérimentales. Or, le RUV-B affecte non seulement les bactéries mais également les ciliés. Il devient donc nécessaire de déterminer l'influence de ces stress multiples sur ces niveaux trophiques. En effet, des études ont démontré que les bactérivores pouvaient être négativement affectés par le RUV-B, favorisant ainsi la croissance bactérienne (Mostajir et al. 1999a). A l'inverse, les hydrocarbures en tant que source de carbone peuvent favoriser cette croissance bactérienne, qui en retour induit une croissance des bactérivores. Ainsi, quelle peut être l'influence d'une co-exposition RUV-B/WSF par exemple sur cette activité de broutage, si l'on considère la rétroaction positive de ces composés chimiques et l'impact négatif direct du RUV-B sur ces niveaux trophiques ?

De plus, considérant plus spécifiquement la réponse bactérienne, il devient intéressant d'appliquer les outils moléculaires maintenant disponibles à de telles études et ceci dans le souci de mieux comprendre les changements dans la composition spécifique. Ce point est d'un intérêt tout particulier si l'on considère le rôle attribué au RUV-B dans le déplacement d'un réseau trophique herbivore vers un réseau trophique microbien avec les implications qui en découlent pour les transferts et flux de carbone au sein de l'écosystème.

En somme, nos résultats démontrent l'existence d'interactions entre le RUV-B et certains contaminants d'importance environnementale majeure. Ces données soulignent l'importance de ces études dans le contexte général du changement climatique par lequel elles peuvent prendre toute leur signification. En effet, dans le dernier report de l'ACIA (Arctic Climate Impact Assessment 2004), la diminution de l'étendue de la glace de même

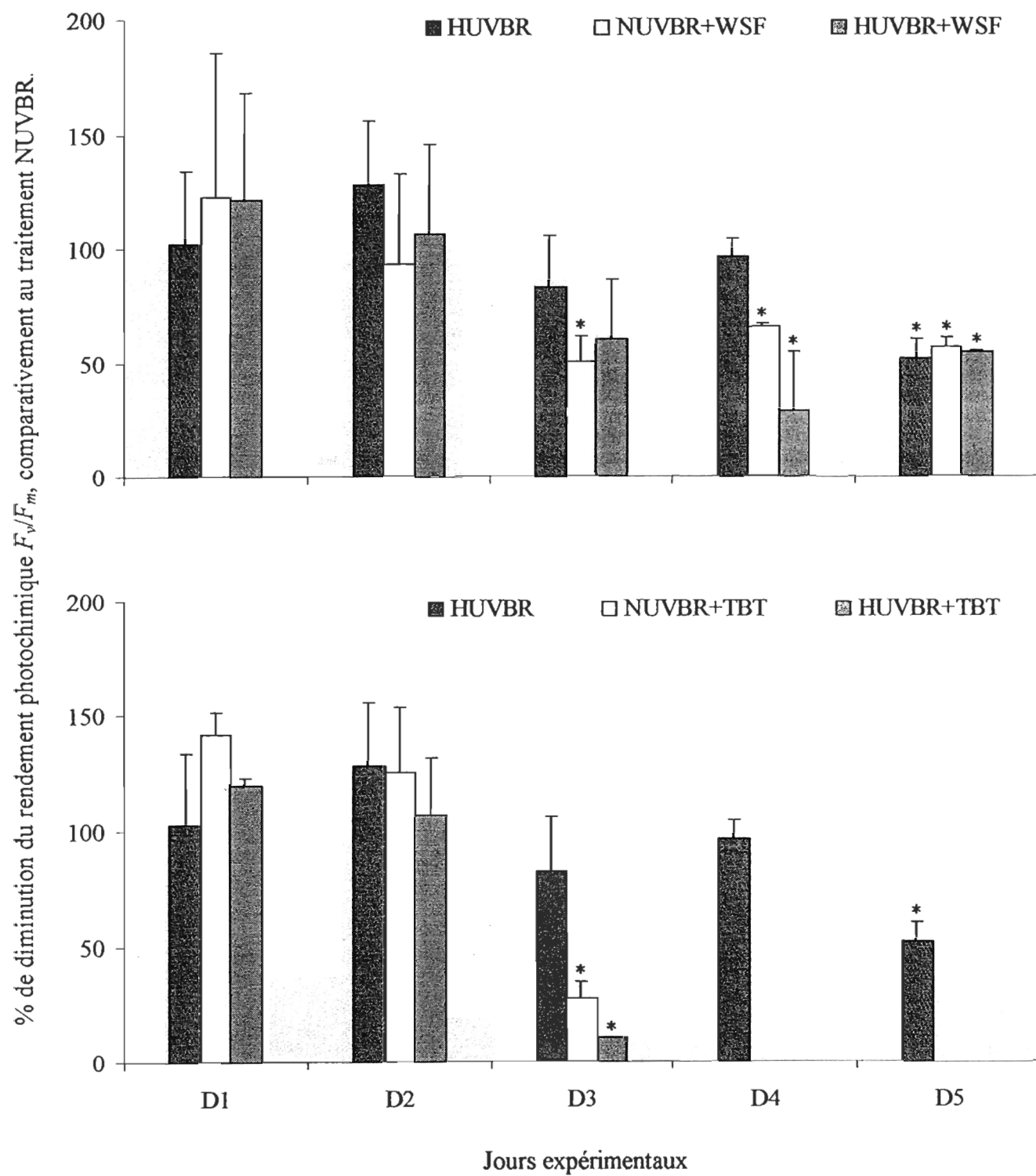
que son épaisseur constituent les premières manifestations du changement climatique dans l'Arctique, et soulèvent non seulement la question de l'ouverture du passage du Nord-Ouest à la navigation commerciale, mais également une intensification des opportunités d'exploitation pétrolière offshore. Or, un accroissement du trafic maritime et de l'exploitation pétrolière impliquent nécessairement une augmentation du risque de contamination par les hydrocarbures pétroliers (i.e. fuites accidentelles, accidents avec déversements massifs). De plus, le changement climatique implique d'autres altérations au niveau de l'Arctique, et plus particulièrement une accentuation continue de la déplétion de la couche d'ozone à plus long terme. En particulier, les gaz à effet de serre devraient accroître le refroidissement radiatif de la basse stratosphère, et augmenter ainsi la stabilité du vortex polaire arctique, créant alors des conditions aggravantes pour la déplétion d'ozone (Rex et al. 2004). Le rétablissement de cette déplétion d'ozone serait alors relativement lent au cours de la prochaine moitié de ce siècle. Ainsi, les niveaux du RUV-B seront plus prononcés au printemps, à une époque où les écosystèmes y sont les plus vulnérables. L'association changement climatique, RUV-B en excès et pollution anthropique représente dès lors une variété de problèmes potentiels pour la santé des écosystèmes nordiques si l'on considère les effets très néfastes d'une co-exposition RUV-B/hydrocarbures que nous avons déjà observés pour les populations planctoniques de l'estuaire du Saint-Laurent, mais aussi pour les populations sub-antarctiques et antarctiques. En effet, en raison de l'attrait touristique que représente le continent austral, l'augmentation croissante du trafic maritime qui en résulte implique inévitablement une contamination de cet écosystème considéré comme "pristine" (HCA 2004). De plus, en

dépit du moratoire de 1991 sur l'exploitation des ressources naturelles en antarctique, les pressions économiques et démographiques constituent des menaces environnementales de part l'augmentation attendue de la demande énergétique mondiale. Ceci pourrait alors exposer l'écosystème Antarctique à l'exploitation des ressources de son sous-sol et aux pollutions associées, de concert avec le trop bien connu "trou" d'ozone et ses effets délétères sur la vie aquatique.

Il en est de même si l'on considère le TBT. En effet, une augmentation du trafic maritime expose les écosystèmes aquatiques à un risque accru face à ce contaminant. Malgré l'interdiction totale du TBT dans les peintures anti-salissures des bateaux d'ici à 2008, ce composé représente une menace directe et durable pour les écosystèmes froids de hautes latitudes déjà contaminés, aussi bien aux latitudes nordiques (Vigilino et al. 2004) qu'australes (Negri et al. 2004). De plus, des études récentes soulignent l'incertitude qui demeure quant à la toxicité et la persistance de nouveaux composés anti-salissures mis sur le marché pour remplacer le TBT (Evans et al. 2000, Okamura et al. 2000, Karlsson & Eklund 2004).

**Annexe 1. % de diminution du rendement photochimique F_v/F_m , comparativement au traitement NUVBR pour l'expérience de Rimouski. (Moyennes \pm DS).
*Différences significatives entre les traitements et comparativement au traitement NUVBR.**

(Chapitres I & III).



BIBLIOGRAPHIE

- Aas P, Lyons MM, Pledger R, Mitchell DL, Jeffrey WH (1996) Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquat Microb Ecol* 11: 229-238
- ACIA (2004) Impacts of a warming Arctic. Arctic Climate Impact Assessment. Cambridge Univ Press: 26p
- Adelman D, Hinga KR, Pilson MEQ (1990) Biogeochemistry of butyltins in an enclosed marine ecosystem. *Environ Sci Technol* 24: 1027-1032
- Albers PH (1995) Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GAJr, Cairns JJr (Eds) *Handbook of ecotoxicology*. Lewis. CRC Press: 330-355
- Ali LN, Mantoura RF, Rowland SJ (1995) The dissolution and photodegradation of Kuwaiti crude oil in seawater. Part 2 : a laboratory photodegradation apparatus and photodegradation kinetics of a model seawater soluble hydrocarbon (phenanthrene). *Mar Environ Res* 40: 319-335
- Alzieu C, Michel P (1998) L'étain et les organoétains en milieu marin : biogéochimie et écotoxicologie. IFREMER-Repères Ocean: 104p
- Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, Hightower GM (1974) Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Mar Biol* 27: 75-88
- Anderson JG, Toohey DW, Brune WH (1991) Free radicals within the Antarctic vortex: the role of CFCs in Antarctic ozone loss. *Science* 251: 39-45
- Arfsten DP, Schaffer DJ, Mulveny DC (1996) The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of PAH in animals and plants: a review. *Ecotox Environ Saf* 33: 1-24

- Atlas RM, Bartha R (1993) *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Wesley A (Ed). Longman Publishers, Amsterdam: 563p
- Austin J, Butchart N, Shine KP (1992) Possibility of an Arctic ozone hole in a doubled-CO₂ climate. *Nature* 360: 221-225
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10: 257-263
- Babu TS, Marder JB, Tripuranthakam S, Dixon DG, Greenberg BM (2001) Synergistic effects of a photooxidised polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth: evidence that in vivo formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity. *Environ Toxicol Chem* 20: 1351-1358
- Bagchi M, Bagchi D, Balmoori J, Ye X, Stohs SJ (1998) Naphthalene-induced oxidative stress and DNA damage in cultured macrophage J774A.1 cells. *Free Rad Biol Med* 25: 137-143
- Bate GC, Crafford SD (1985) Inhibition of phytoplankton photosynthesis by the WSF of used lubricating oil. *Mar Pollut Bull* 16: 401-404
- Beaumont AR, Newman PB (1986) Low levels of tributyltin reduce growth of marine micro-algae. *Mar Pollut Bull* 17: 457-461
- Behrenfeld MJ, Chapman JW, Hardy JT, Lee II HL (1993a) Is there a common response to ultraviolet-B radiation by marine phytoplankton ? *Mar Ecol Prog Ser* 102: 59-68

- Behrenfeld MJ, Hardy JT, Gucinski H, Hanneman A, Lee II H, Wones A (1993b) Effects of ultraviolet-B radiation on primary production along latitudinal transects in the South Pacific ocean. *Mar Environ Res* 35: 349-363
- Behrenfeld MJ, Hardy JT, Lee II J (1992) Chronic effects of ultraviolet-B radiation on growth and cell volume of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 28: 725-760
- Bertrand JC, Mille G (1989) Devenir de la matière exogène. Un modèle : les hydrocarbures. In: Bianchi M, Marty D, Bertrand JC, Caumette P, Gauthier M (Eds) *Micro-organismes dans les systèmes océaniques*. Masson, Paris: 343-385
- Blunden SJ, hapman AH (1982) The environmental degradation of organotin compounds – a review. *Environ Technol Lett* 3: 267-272
- Boelen P, Obernosterer I, Vink AA, Buma AGJ (1999) Attenuation of biologically effective UV radiation in tropical atlantic waters measured with a biochemical DNA dosimeter. *Photochem Photobiol* 69: 34-40
- Booth CR, Morrow JH, Coohill TP, Cullen JJ, Frederick JE, Häder D-P, Holm-Hansen O, Jeffrey WH, Mitchell DL, Neale PJ, Sobolev I, van der Leun J, Worrest RC (1997) Impacts of solar UVR on aquatic microorganisms. *Photochem Photobiol* 65: 252-269
- Buma AGJ, Van Hannen EJ, Roza L, Veldhuis MJW, Gieskes WWC (1996a) Monitoring ultraviolet-B induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimer detection. *J Phycol* 31: 314-321
- Buma AGJ, Zemmeling HJ, Sjollem K, Gieskes WWC (1996b) UVB radiation modifies protein and photosynthetic pigment content, volume and ultrastructure of marine diatoms. *Mar Ecol Prog Ser* 142: 47-54

- Bushaw KL, Zepp RG, Tarr MA, Schulz-Jander D, Bournonniere RA, Hodson RE, Miller WL, Bronk DA, Moran MA (1996) Photochemical release of biologically available nitrogen from aquatic dissolved organic matter. *Nature* 381: 404-407
- Cairns J Jr (1988) Putting the eco in ecotoxicology. *Reg Toxicol Pharm* 8: 226-235
- Calabrese EJ (1991) *Multiple chemical interactions*. Lewis, Chelsea: 704p
- Chatila K, Demers S, Mostajir B, Gosselin M, Chanut J-P, Monfort P, Bird D (2001) The responses of a natural bacterioplankton community to different levels of ultraviolet-B radiation: a food web perspective. *Microb Ecol* 41: 56-68
- Cho BC, Azam F (1988) Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the oceans's interior. *Nature* 332: 441-443
- Cockell CS (1998) Ultraviolet radiation, evolution and the pi-electron system. *Biol J Lin Soc* 63: 449-457
- Crosby DG (1994). *Dynamic environmental factors*. Chapter 1 : Photochemical aspects of bioavailability. In: Hamelink JL, Landrum PF, Bergman HL, Benson WH (Eds) *Bioavailability: physical, chemical and biological interactions*. Proceeding of the thirteenth Pellston Workshop, Lewis Publishers, SETAC: 109-118
- Cullen JJ, Lesser MP (1991) Inhibition of photosynthesis by ultraviolet radiation as a function of dose and dosage rate: results for a marine diatom. *Mar Biol* 111: 183-190
- Cullen JJ Lewis M (1988) The kinetics of algal photoadaptation in the context of vertical mixing. *J Plankton Res* 10: 1039-1063
- Cullen JJ, Neale PJ (1994). Ultraviolet radiation, ozone depletion and marine photosynthesis. *Photosynthesis Res* 39: 303-320

- Cutchis P (1974) Stratospheric ozone depletion and solar ultraviolet radiation on Earth. *Science* 184: 13-19
- Dabestani R, Ivanov IN (1999) A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochem Photobiol* 70: 10-34
- De Lange HJ, Morris DP, Williamson CE (2003) Solar ultraviolet degradation of DOC may stimulate freshwater food webs. *J Plankton Res* 25: 111-117
- Delille D, Bassères A, Dessommès A (1998) Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater. *Polar Biol* 19: 237-241
- Delille D, Siron R (1993) Effect of dispersed oil on heterotrophic bacterial communities in cold marine waters. *Microb Ecol* 25: 263-273
- Döhler G (1984) Effect of UV-B radiation on biomass production, pigmentation, and protein content of marine diatoms. *Z Naturf* 39c: 634-638
- Döhler G (1985) Effect of UV-B radiation (290-320 nm) on the nitrogen metabolism of several marine diatoms. *J Plant Physiol* 118: 391-400
- Döhler G, Biermann I (1987) Effect of UV-B irradiance on the response of ¹⁵N-uptake of *Lauderia annulata* and *Synedra planctonica*. *J Plankton Res* 9: 881-890
- Dubey SK, Roy U (2003). Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *Appl Organomet Chem* 17: 3-8
- Estrada M, Marrasé C, Salt J (1996) *In vivo* fluorescence/chlorophyll *a* ratio as an ecological indicator in oceanography. *Sci Mar* 60: 317-325
- Evans SM, Birchenough AC, Brancato MS (2000) The TBT Ban: Out of the Frying Pan into the Fire? *Mar Pollut Bull* 40: 204-211

- Fargašová A (1996) Inhibitive effect of organotin compounds on the chlorophyll content of the green freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. Bull Environ Toxicol 57: 99-106
- Fargašová A (1997) The effects of organotin compounds on growth, respiration rate, and chlorophyll a content of *Scenedesmus quadricauda*. Ecotoxicol Environ Saf 37: 193-198
- Farman JC, Gardiner BG, Shanklin JD (1985) Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. Nature 315: 207-210
- Fauchot J, Gosselin M, Levasseur M, Mostajir B, Belzile C, Demers S, Roy S, Villegas PZ (2000) Influence of UV-B radiation on nitrogen utilization by a natural assemblage of phytoplankton. J Phycol 36: 484-496
- Fent K (1996) Ecotoxicology of organotin compounds. Crit-Rev Toxicol 26: 1-117
- Foote CS (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. Photochem Photobiol 54: 659
- Fouilland E, Gosselin M, Mostajir B, Levasseur M, Chanut J-P, Demers S, de Mora S (2003) Effects of ultraviolet-B radiation and vertical mixing on nitrogen uptake by a natural planktonic community shifting from nitrate to silicic acid deficiency. Limnol Oceanogr 48: 18-30
- Frontier S, Pichod-Viale D (1995) Ecosystèmes : structure, fonctionnement, évolution. Collection d'écologie n°21. Masson (Ed): 447p
- Gearing JN (1988) The role of aquatic microcosms in ecotoxicology research as illustrated by large marine systems. In: Levin SA, Harwell MA, Kelly JR, Kimball KD (Eds) Ecotoxicology : problems and approaches. Springer-Verlag: 411-470

- Girotti AW (1990) Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem Photobiol* 51: 497-509
- Goldberg ED (1986) TBT: an environmental dilemma. *Environ* 28: 17-20/42-44
- Griffiths RP, MacNamara TM, Cadwell BA, Morita RY (1981) Field observations on the acute effect of crude oil on glucose and glutamate uptake in samples collected from Arctic and subArctic waters. *Appl Environ Microbiol* 41: 1400-1406
- Hada M, Hashimoto T, Nikaido O, Shin M (1998) UVB induced DNA damage and its photorepair in nuclei and chloroplasts of *Spinacia oleracea* L. *Photochem Photobiol* 68: 319-322
- Häder D-P, Worrest RC (1991) Effects of enhanced ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. *Photochem Photobiol* 53: 717-725
- Harayama S (1997) Polycyclic aromatic hydrocarbons bioremediation design. *Curr Opin Biotechnol* 8: 268-273
- Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 63-70
- Harino H, Fukushima M, Kurokawa Y, Kawai S (1997) Susceptibility of bacterial populations to organotin compounds and microbial degradation of organotin compounds in environmental waters. *Environ Pollut* 98: 157-162
- Harrison PJ, Cochlan W P, Acreman JC, Parsons TR, Thompson PA, Dovey HM (1986) The effects of crude oil and Corexit 9527 on marine phytoplankton in an experimental enclosure. *Mar Environ Res* 18: 93-109
- Harvey RG (1991) Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity. Cambridge University Press, Cambridge: 396p

- HCA (Hydrographic committee on Antarctica) (2004). IHAO Hydrographic committee on Antarctica, 4TH meeting, Kythnos, Greece. 6-8 sept.: 31p
- Hedges JI (1992) Global biogeochemical cycles: progress and problems. *Mar Chem* 39: 67-93
- Helbling EW, Villafañe V, Ferrario M, Holm-Hansen O (1992) Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar Ecol Prog Ser* 80: 89-100
- Herndl GJ, Müller-Niklas G, Frick J (1993) Major role of ultraviolet B in controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. *Nature* 361: 717 – 719
- Hoch M (2001) Organotin compounds in the environment – an overview. *Appl Geochem* 16: 719-743
- Hodson RE, Azam F, Lee RF (1977) Effects of four oils on marine bacterial populations: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull Mar Sci* 27: 119-126
- Huang G, Dai S, Sun H (1996) Toxic effects on organotin species on algae. *Appl Organomet Chem* 10: 377-387
- Huang G, Bai Z, Dai S, Xie Q (1993a) Accumulation and toxic effect of organometallic compounds on algae. *Appl Organomet Chem* 7: 373-380
- Huang XD, McConkey BJ, Babu ST, Greenberg BM (1997a) Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (duckweed). *Environ Toxicol Chem* 16: 1707-1715
- Huang XD, Dixon DG, Greenberg BM (1993b) Impacts of UV radiation and photomodification on the toxicity of PAHs to the higher plant *Lemna gibba* (duckweed). *Environ Toxicol Chem* 12: 1067-1077

- Huang XD, Krylov SN, Ren L, McConkey BJ, Dixon DG, Greenberg BM (1997b) Mechanistic quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: II. An empirical model for the toxicity of 16 PAHs to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Environ Toxicol Chem* 16: 2296-2303
- Jokiel PL, York RH Jr (1984) Importance of ultraviolet radiation in photoinhibition of microalgal growth. *Limnol Oceanogr* 29: 192-199
- Karentz D, Cleaver JE, Mitchell DL (1991) Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J Phycol* 27: 326-341
- Karlsson J, Eklund B (2004) New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Mar Pollut Bull* 49: 456-464
- Karydis M (1982) Toxicity of a photooxidised crude oil on two marine microalgae. *Bot Mar* XXV: 25-29
- Kawai S, Kurokawa Y, Harino H, Fukushima M (1998) Degradation of tributyltin by a bacterial strain isolated from polluted river water. *Environ Pollut* 102: 259-263
- Keller AA, Hargrave P, Jeon H, Klein-MacPhee G, Klos E, Oviatt C, Zhang J (1997) Effects of ultraviolet-B enhanced on marine trophic levels in a stratified coastal system. *Mar Biol* 130: 277-287
- Kieber DJ (2000) Photochemical production of biological substrates. In: de Mora SJ, Demers S, Vernet M (Eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge environmental chemistry series. University Press 10: 130-148
- Kieber DJ, McDaniel J, Mopper K (1989) Photochemical source of biological substrates in sea water: implications for carbon cycling. *Nature* 341: 637-639

- Kieber DJ, Peake BM, Scully NM (2003) Reactive oxygen species in aquatic ecosystems. In: Helbling EW, Zagarese H (Eds) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Royal Society of Chemistry, Cambridge: 251-288
- Krylov SN, Huang X-D, Zeiler LF, Dixon DG, Greenberg BM (1997) Mechanism quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: I. Physical model based on chemical kinetics in a two-compartment system. *Environ Toxicol Chem* 16: 2283-2295
- Kubota N, Mimura H, Yanauchi T, Kitamura A (2004) Accelerator analyses of tributyltin chloride associated with a tributyltin resistant marine microorganism. *Mar Pollut Bull* 48: 800-805
- Kuiper J (1982) Ecotoxicological experiments with marine plankton communities in plastic bags. In: Grice GD, Reeve MR (Eds) *Marine mesocosms: biological and chemical research in experimental ecosystems*. Springer-Verlag: 181-193
- Kuiper J, Brockmann UH, van het Groenewoud H, Hoornsman G, Hammer KD (1983) Influences of bag dimensions on the development of enclosed plankton communities during POSER. *Mar Ecol Prog Ser* 14: 9-17
- Lalli CM (1990) Enclosed experimental marine ecosystems: a review and recommendations. *Coastal and estuarine studies* Vol. 37. Springer-Verlag: 218p
- Larson RA, Berenbaum MR (1988) Environmental phototoxicity. *Environ Sci Technol* 22: 354-360
- Laughlin RBJr, Guard HE, Coleman WM (1986) Tributyltin in seawater: speciation and octanol-water partition coefficient. *Environ Sci Technol* 20: 201-204
- Laughlin RB, Johannesen RB, French W, Guard HE, Brinckman FE (1987) Structure activity relationships for organotin compounds. *Environ Toxicol Chem* 4: 343-351

- Lee RF, Valkirs AO, Seligman PF (1989) Importance of microalgae in the biodegradation of tributyltin in estuarine waters. *Environ Sci Technol* 23: 1515-1518
- Legendre L, Michaud J (1998) Flux of biogenic carbon in oceans: size-dependent regulation by pelagic food webs. *Mar Ecol Prog Ser* 164: 1-11
- Lindell MJ, Granéli W, Tranvik LJ (1995) Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 40: 195-199
- Little EE, Cleveland L, Calfee R, Barron MG (2000) Assessment of the photoenhanced toxicity of a weathered oil to the tidewater silverside. *Environ Toxicol Chem* 19: 926-932
- Lorenzen C (1979) Ultraviolet radiation and phytoplankton photosynthesis. *Limnol Oceanogr* 24: 1117-1120
- Maguire RJ (1987) Environmental aspect of tributyltin. *Appl Organomet Chem* 1: 475-498
- Maguire RJ (2000) Review of the persistence, bioaccumulation and toxicity of tributyltin in aquatic environments in relation to Canada's Toxic Substances Management Policy. *Wat Qual Res J Can* 35: 633-679
- Maguire RJ (1991) Aquatic environmental aspects of non-pesticidal organotin compounds. *Wat Pollut Res J Can* 26: 243-360
- Maguire RJ, Carey JH, Hale EJ (1983) Degradation of the tri-*n*-butyltin species in water. *J Agric Food Chem* 31: 1060-1065

- Maguire RJ, Wong PTS, Rhamey JS (1984) Accumulation and metabolism of tri-*n*-butyltin cation by a green alga, *Ankistrodesmus falcatus*. *Can J Fish Aquat Sci* 41: 537-540
- Malinsky-Rushansky NZ, Legrand C (1996) Excretion of dissolved organic carbon by phytoplankton of different sizes and subsequent bacterial uptake. *Mar Ecol Prog Ser* 132: 249-255
- Mallakin A, McConkey BJ, Miao G, McKibben B, Snieckus V, Dixon DG, Greenberg B (1999) Impacts of structural photomodification on the toxicity of environmental contaminants: Anthracene photooxidation products. *Ecotoxicol Environ Saf* 43: 204-212
- Marwood CA, Smith REH, Solomon KR, Charlton MN, Greenberg BM (1999) Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assemblage of lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation. *Ecotoxicol Environ Saf* 44: 322-327
- McDonald BG, Chapman PM (2002) PAH phototoxicity-an ecological irrelevant phenomenon ? *Mar Pollut Bull* 44: 1321-1326
- McDonald L, Trevors JT (1988) Review of tin resistance, accumulation and transformations by microorganisms. *Wat Air Soil Pollut* 40: 215-221
- Mekenyan OG, Ankley GT, Veith GD, Call DJ (1994) QSARs for photoinduced toxicity: 1. Acute lethality of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 28: 567-582
- Molina MJ, Rowland FS (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine-atom catalysed destruction of ozone. *Nature* 249: 810-812

- Mopper K, Zhou X, Kieber RJ, Kieber DJ, Sikorski RJ, Jones RD (1991) Photochemical degradation of dissolved organic carbon and its impact on the oceanic carbon cycle. *Nature* 353: 60-62
- Moran M, Zepp RG (1997) Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 42: 1307-1316
- Mostajir B, Demers S, de Mora S, Belzile C, Chanut J-P, Gosselin M, Roy S, Zulema Villegas P, Fauchot J, Bouchard J, Bird D, Monfort P, Levasseur M (1999a) Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation on a planktonic community. *Limnol Oceanogr* 44: 586-596
- Mostajir B, Demers S, de Mora SJ, Bukata RP, Jerome JH (2000) Implications of UV radiation on the food web structure and consequences on the carbon flow. In: de Mora S, Demers S, Vernet M (Eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge environmental chemistry series. University Press 10: 310-320
- Mostajir B, Sime-Ngando T, Demers S, Belzile C, Roy S, Gosselin M, Chanut J-P, de Mora S, Fauchot J, Vidussi F, Levasseur M (1999b) Ecological implications of changes in cell size and photosynthetic capacity of marine *Prymnesiophyceae* induced by ultraviolet-B radiation. *Mar Ecol Prog Ser* 187: 89-100
- Mouhri K, Loudiki M, Marsot P, Pelletier É (1998). Effet du chlorure de tributylétain sur la croissance et le métabolisme de la diatomée marine *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin) en culture continue (Chémostat). *J Rech Oceanogr* 23: 117-124
- Mousseau L, Gosselin M, Levasseur M, Demers S, Fauchot J, Roy S, Villegas PZ, Mostajir B (2000) Effects of ultraviolet-B radiation on simultaneous carbon and

- nitrogen transport rates by estuarine phytoplankton during a week-long mesocosm study. *Mar Ecol Prog Ser* 199: 69-81
- Mousseron-Canet M, Mani J-C (1969) *Photochimie et réactions moléculaires : Chapitre I : Définitions . Lois de la photochimie*. DUNOD, Paris: 1-9
- Mülher R, Crutzen PJ, Groob JU, Brühl C, Russel JM, Gernandt H, McKenna DS, Tuck AF (1997) Severe chemical ozone loss in Arctic during the winter of 1995-96. *Nature* 389: 709-712
- Müller-Niklas G, Heissenberger A, Puškarić S, Herndl GJ (1995) Ultraviolet-B radiation and bacterial metabolism in coastal waters. *Aquat Microb Ecol* 9: 111-116
- Neff JM (1979) *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. Applied Science Publishers LTD: 262p
- Negri AP, Hales LT, Battershill C, Wolff C, Webster NS (2004) TBT contamination identified in Antarctic marine sediments. *Mar Pollut Bull* 48: 1142-1144
- Newsted JL, Giesy JP (1987) Predictive models for photoinduced acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, Crustacea). *Environ Toxicol Chem* 6: 445-461
- Nikkilä A, Penttinen S, Kukkonen JVK (1999) UV-B induced acute toxicity of pyrene to the waterflea *Daphnia magna* in natural freshwaters. *Ecotoxicol Environ Saf* 44: 271-279
- Okamura H, Aoyama I, Liu D, Maguire RJ, Pacepavicius GJ, Lau YL (2000) Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irargol 1051 in the aquatic environment. *Wat Res* 34: 3523-3530

- Pain A, Cooney JJ (1998) Characterization of Organotin-Resistant Bacteria from Boston Harbor Sediments. *Arch Environ Toxicol* 35: 412-416
- Parsons TR, Harrison PJ, Acreman JC, Dovey HM, Thompson PA, Lalli CM (1984) An experimental marine ecosystem response to crude oil and Corexit 9527: Part 2- Biological effects. *Mar Environ Res* 13: 265-275
- Payne JR, Phillips CR (1985) Photochemistry of petroleum in water. *Environ Sci Technol* 19: 569-579
- Pelletier MC, Burgess RM, Ho KT, Kuhn A, McKinney RA, Ryba SA (1997) Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environ Toxicol Chem* 16: 2190-2199
- Petersen S, Gustavson K (1998) Toxic effects of tri-butyl-tin (TBT) on autotrophic pico-, nano-, and microplankton assessed by a size fractionated pollution-induced community tolerance (SSF-PICT) concept. *Aquat Toxicol* 40: 253-264
- Petersen S, Gustavson K (2000) Direct toxic effects of TBT on natural enclosed phytoplankton at ambient TBT concentrations of coastal waters. *Ecotoxicol* 9: 273-285
- Posthuma J (1977) The composition of petroleum. *Rapp P-v Réu Cons Int Explor Mer* 171: 7-16
- Powell RT, Wilson-Finelli A (2003) Photochemical degradation of organic iron complexing ligands in seawater. *Aquat Sci* 65: 367-374
- Prince RC (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit Rev Microbiol* 19: 217-242
- Ramade F (1992) Précis d'écotoxicologie. Collection d'écologie n°22. Masson (Ed): 300p

- Raven JA, Samuelsson G (1986) Repair of photoinhibitory damage in *Anacystis nidulans* 625: relating catalytic capacity for, and energy supply to protein synthesis, and implications for Pmax and the efficiency of light-limited growth. *New Phytol* 103: 625–643
- Reader S, Pelletier É (1992) Biosorption and degradation of butyltin compounds by the marine diatom *Skeletonema costatum* and the associated bacterial community at low temperature. *Bull Environ Contam Toxicol* 48: 599-607
- Ren L, Huang X-D, McConkey BJ, Dixon DG, Greenberg BM (1994) Photoinduced toxicity to three polycyclic aromatic hydrocarbons (fluorethene, pyrene and naphthalene) to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Ecotoxicol Environ Saf* 28: 160-171
- Rex M, Harris NRP, von der Gathen P, Lehmann R, Braathen GO, Reimer E, Beck A, Chipperfield MP, Alfier R, Allaart M, O'Connor F, Dier H, Dorokhov V, Fast H, Gil M, Kyrö E, Litynska Z, Mikkelsen IS, Molyneux MG, Nakane H, Notholt J, Rummukainen M, Viatte P, Wenger J (1997) Prolonged stratospheric ozone loss in the 1995-96 Arctic winter. *Nature* 389: 835-837
- Rex M, Salawitch RJ, von der Gathen P, Harris NRP, Chipperfield MP, Naujokat B (2004) Arctic ozone loss and climate change. *Geophys Res Lett* 31: L04116
- Rowland FS (1989) Chlorofluorocarbons and the depletion of stratospheric ozone. *Am Sci* 77: 36-45
- Roy S (2000) Strategies for the minimisation of UV-induced damage. In: de Mora S, Demers S, Vernet M (Eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge Environmental Chemistry. University Press: 177-205

- Roy S, Siron R, Pelletier É (1991) Comparison of radiocarbon uptake and DCMU-fluorescence techniques in evaluating dispersed oil effects on phytoplankton photosynthetic activity. *Wat Res* 25: 1249-1254
- Saint-Louis R (1994) Rôle du phytoplancton dans le devenir des organoétains à l'interface air-mer. Thèse Ph. D., n°13, Université du Québec à Rimouski, Québec: 118p
- Saint-Louis R, Pelletier É, Marsot P, Fournier R (1994) Distribution et effets du chlorure de tributylétain et de ses produits de dégradation sur la croissance de l'algue marine *Pavlova lutheri* en culture continue. *Wat Res* 28: 2533-2544
- Saint-Louis R, Pelletier É, Marsot P (1997). A mechanistic approach to tributyltin (TBT) sorption by marine microflagellated alga *Pavlova lutheri*. *Appl Organomet Chem* 11: 543-550
- Saint-Louis R, Pelletier É (2003) Sea-to-air flux of contaminants via bubbles bursting, An experimental approach for tributyltin. *Mar Chem* 84: 211-224
- Schofield O, Kroon BMA, Prézélin BB (1995) Impact of ultraviolet-B radiation on photosystem II activity and its relationship to the inhibition of carbon fixation rates for antarctic ice algae communities. *J Phycol* 31: 703-715
- Scully NM, Cooper WJ, Tranvik LJ (2003) Photochemical effects on microbial activity in natural waters: the interaction between oxygen species and dissolved organic matter. *FEMS Microbiol Ecol* 46: 353-357
- Seligman PF, Valkirs AO, Lee RF (1986) Degradation of tributyltin in San Diego Bay, California, waters. *Environ Sci Technol* 20: 1229-1235
- Setlow RB, Swenson PA, Carrier WL (1963) Thymine dimers and inhibition of DNA synthesis by ultraviolet irradiation of cells. *Science* 142: 1464-1466

- Sidharthan M, Young KS, Woul LH, Soon PK, Shin HW (2002) TBT toxicity on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Mar Pollut Bull* 45: 177-182
- Siron R, Giusti G, Berland B, Morales-Loo R, Pelletier É (1991) Water-soluble petroleum compounds: chemical aspects and effects on the growth of microalgae. *Sci Total Environ* 104: 211-227
- Siron R, Pelletier É, Delille D, Roy S (1993) Fate and effects of dispersed crude oil under icy conditions simulated in mesocosms. *Mar Environ Res* 35: 273-302
- Siron R, Pelletier É, Roy S (1996) Effects of dispersed and adsorbed crude oil on microalgal and bacterial communities of cold seawater. *Ecotoxicol* 5: 229-251
- Smith RC, Baker KS, Holm-Hansen O, Olson RS (1980) Photoinhibition of photosynthesis in natural waters. *Photochem Photobiol* 31: 585-592
- Sommaruga R, Sattler B, Oberleiter A, Wille A, Wögrath-Sommaruga S, Psenner R, Felip M, Camarero L, Pina S, Gironés R, Catalán J (1999) An in situ enclosure experiment to test the solar UVB impact on plankton in a high-altitude mountain lake. II. Effects on the microbial food web. *J Plankton Res* 21: 859-876
- Stebbing ARD (1985) Organotins and water quality – some lessons to be learned. *Mar Pollut Bull* 16: 383-390
- Takahashi M (1990) Pelagic mesocosms: I. Food chain analysis. In: Malli CM (Ed) *Enclosed experimental marine ecosystems: a review and recommendations*. Coastal and estuarine studies Vol. 37. Springer-Verlag: 61-80
- Tam NFY, Chong AMY, Wong YS (2002). Removal of tributyltin (TBT) by live and dead microalgal cells. *Mar Pollut Bull* 45: 362-371
- THESEO (2000). <http://www.nilu.no/projects/theseo2000/>. The Third European Stratospheric Experiment on Ozone.

- Tobin JM, Cooney JJ (1999) Action of inorganic tin and organotin on hydrocarbon-using yeast, *Candida maltosa*. Arch Environ Contam Toxicol 36: 7-12
- Tsang CK, Lau PS, Tam NFY, Wong YS (1999) Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chorella* species. Environ Pollut 105: 289-297
- Vandermeulen JH, Ahern TP (1976) Effect of petroleum hydrocarbons on algal physiology: review and progress report. In: Lockwood (Ed) Effects of pollutants on aquatic organisms. Cambridge University Press: 107-125
- Vasseur C (2003) Rôle du rayonnement ultraviolet-B sur la structure et le fonctionnement du réseau trophique microbien de la Polynie North Water (75-79°N), Arctique canadien. Thèse Ph. D., n°50, Université du Québec à Rimouski, Québec: 224p
- Vasseur C, Mostajir B, Nozais C, Denis M, Fouilland E, Klein B, Demers S (2003). Effects of bio-optical factors on the attenuation of ultraviolet and photosynthetically available radiation in the North Water Polynia, northern Baffin Bay ecological implications. Mar Ecol Prog Ser 252: 1-13
- Veith GD, Mekenyan OG, Ankley GT, Call DJ (1995). A QSAR analysis of substituent effects on the photoinduced acute toxicity of PAHs. Chemosphere 30: 2129-2142
- Vernet M (2000) Effects of UV radiation on the physiology and ecology of marine phytoplankton. In: de Mora S, Demers S, Vernet M (Eds) The effects of UV radiation in the marine environment. Cambridge Environmental Chemistry, University Press: 237-278
- Viglino L, Pelletier É, Saint-Louis R (2004) Highly persistent butyltins in northern marine sediments: a long-term threat for the Saguenay Fjord (Canada). Environ Toxicol Chem 23: 2673-2681

- Vincent WF, Neale PJ (2000) Mechanisms of UV damage in aquatic organisms. In: de Mora S, Demers S, Vernet M (Eds) The effects of UV radiation in the marine environment. Cambridge Environmental Chemistry. University Press: 149-176
- Vincent WF, Roy S (1993) Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environ Rev* 1: 1-12
- Waite TD, Szymczak R (1994) Photoredox transformations of iron and manganese in marine systems: Review of recent field investigations. In: Helz GR, Zepp RG, Crosby DG (Eds) Aquatic and surface photochemistry. Lewis Publishers, Ann Arbor, MI: 39-52
- Wetzel RG, Hatcher PG, Bianchi TS (1995) Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. *Limnol Oceanogr* 40: 1369-1380
- Whitehead RF, de Mora SJ, Demers S (2000) Enhanced UV radiation – a new problem for the marine environment. In: de Mora S, Demers S, Vernet M (Eds) The effects of UV radiation in the marine environment. Cambridge environmental chemistry series. University Press 10: 1-34
- Wickham S, Carstens M (1998) Effects of ultraviolet-B radiation on two arctic microbial food webs. *Aquat Microbiol Ecol* 16: 163-171
- Winter K, Van Baalen C, Nicol JAC (1977) Water soluble extractives from petroleum oils: chemical characterization and effects on microalgae and marine animals. *Rapp P-v Reun Cons Int Explor Mer*, 171: 166-174
- Wood AM, Rai H, Garnier J, Kairesalo T, Gresens S, Orive E, Ravail B (1992). Practical approaches to algal excretion. *Mar Micro Foods Webs* 6: 21-38

- Worrest R, Thomson BE, Van Dyke H (1981a) Impact of UV-B radiation upon estuarine microcosms. *Photochem Photobiol* 33: 861-867
- Worrest R, Van Dyke H, Thomson BE (1978) Impact of enhanced simulated solar ultraviolet radiation upon a marine community. *Photochem Photobiol* 27: 471-478
- Worrest R, Wolniakowski KU, Scott J, Brooker D, Thomson B, Van Dyke H (1981b) Sensitivity of marine phytoplankton to UV-B radiation: impact upon a model ecosystem. *Photochem Photobiol* 33: 223-227
- Zepp RG, Cline DM (1977) Rates of direct photolysis in aquatic environment. *Environ Sci Technol* 11: 359-365